



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE BIOCENCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

GLEYCIELLE ALEXANDRE CAVALCANTE

**LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA: Associações entre aspectos  
clínicos e mecanismos imunológicos em pacientes**

Recife

2018

GLEYCIELLE ALEXANDRE CAVALCANTE

**LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA: Associações entre aspectos clínicos e mecanismos imunológicos em pacientes**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, para a obtenção do Título de Mestre em Inovação Terapêutica.

Área de concentração: Fármacos, medicamentos e insumos Essenciais à Saúde.

**Orientação:** Dra. Valéria Pereira Hernandes

**Co-orientação:** Dra. Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro.

Recife

2018

Catálogo na fonte

Elaine Barroso

CRB 1728

Cavalcante, Gleycielle Alexandre

Leishmaniose Tegumentar Americana: associações entre aspectos clínicos e mecanismos imunológicos em pacientes / Gleycielle Alexandre Cavalcante- 2018.

81 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Valéria Pereira Hernandes

Coorientadora: Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2018.

Inclui referências, apêndices e anexo

1. Leishmaniose Tegumentar Americana 2. Linfócitos T 3. Citometria de fluxo I. Hernandes, Valéria Pereira (orient.) II. Castro, Maria Carolina Accioly Brelaz de (coorient.) III. Título

616.9364

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-477

GLEYCIELLE ALEXANDRE CAVALCANTE

**LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA: Associações entre aspectos clínicos e imunológicos em pacientes.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para a obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica

Aprovada em: 06/02/2018

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Valéria Pereira Hernandes (Orientadora)

Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães/ CPqAM-FIOCRUZ

---

Profa. Dra. Maíra Galdino da Rocha Pitta (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco/ UFPE

---

Prof. Dr. Eduardo Henrique Gomes Rodrigues (Examinador Externo)

Faculdades Integradas da Vitória/Faintvisa-PE

---

Profa. Dra. Aline Caroline da Silva Santos (Examinador Externo)

Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães/CPqAm- Fiocruz-PE

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais Alexandre e Helena, por todo o apoio, incentivo, amor e dedicação á minha criação ao longo de todos esses anos. Vocês são meu alicerce, o apoio de vocês me tornou forte e é em vocês que me inspiro todos os dias. Aos meus familiares que sempre estiveram presentes acompanhando cada passo da minha jornada. E ao meu esposo Thiago Carvalho pela paciência e todo carinho que me dedicou.

À minha orientadora Valéria, pela oportunidade e pelo apoio em todos os momentos da minha pós-graduação e na minha vida pessoal, sempre estando disponível para me dar os conselhos certos na hora certa. À minha co-orientadora Maria Carolina, sem a qual nada disso teria sido possível. Obrigada por lutar comigo, por estar sempre presente, por acreditar que eu seria capaz e principalmente por me dar as broncas certas nos momentos necessários, sem nunca perder o carinho e a delicadeza. Agradeço sua orientação, amizade, confiança.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram com essa formação, sobretudo aos membros do grupo de pesquisa, ainda Andresa Oliveira, Thiago André, Aline Caroline e a Beatriz Oliveira, Ailton Álvaro, Sophia, Allana, Carla Mola, Marton Kaique e Rafael que me acolheram e sempre estiveram disponíveis a me auxiliar. Peço desculpas àqueles que não citei o nome.

Agradeço ainda aos meus queridos amigos. Irmãos que ganhei nessa vida e estarão em meu coração para sempre. Carina, TÁCILA e Sarana. O apoio de voc/ês foi muito importante e sem ele tenho certeza de que não conseguiria realizar esse sonho.

E em especial ao meu filho Henrique, a jóia mais preciosa que tenho em minha vida e com certeza o motivo pelo qual acordo todos os dias disposta a ser melhor e fazer um mundo melhor.

A Maria Edileuza Brito pelo apoio com os pacientes e com o diagnóstico. Ao Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães por fornecer a estrutura e todos os equipamentos que foram necessários para o desenvolvimento desse trabalho. A pós-graduação em Inovação Terapêutica da UFPE pela oportunidade e apoio para o desenvolvimento da tese. Em especial ao secretário Paulo Germano pelo auxílio. A

FACEPE e ao CNPq por financiar o estudo. A todos aqueles por ventura não mencionados aqui, mas que contribuíram de alguma maneira para esse trabalho, meus agradecimentos!

## RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença negligenciada com distribuição mundial, que acomete principalmente as populações de menor *status* socioeconômico. No Brasil, sua distribuição é heterogênea, sendo observada em todos os estados e, em Pernambuco apresenta-se como doença endêmica. Suas manifestações clínicas variam, sendo a forma cutânea a forma mais comum. A resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro desempenha um importante papel na cura clínica da doença ou na sua progressão, e os linfócitos T, bem como células NK são fundamentais, por serem fontes produtoras de citocinas e por atuarem na resposta imune imediata à infecção. Dessa maneira, os objetivos desse estudo foram caracterizar os pacientes quanto aos aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais, identificar no sangue periférico de pacientes com LTA as células NK e NKT, linfócitos T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup> e associar o perfil fenotípico observado com a evolução clínica dos pacientes avaliados. A imunofenotipagem foi feita por citometria de fluxo, avaliando moléculas presentes na superfície de células mononucleares do sangue periférico de pacientes com a doença ativa após o período de 72h de cultura, após a estimulação com antígeno total de *L. brasiliensis*. Os resultados desse trabalho, demonstraram que células NK, NKT e T CD8<sup>+</sup>, estiveram presentes em maior quantidade no sangue desses pacientes. Sendo importantes na imunidade imediata à LTA. Além disso, foi visto que antígeno total de *L. (V.) braziliensis* é capaz de induzir uma resposta imune específica por parte dos pacientes com LTA, nos períodos iniciais da infecção e que o balanço entre células da imunidade inata e adaptativa contribuem para a proteção à doença. O estudo mostrou que a resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro na LTA é dinâmica, e contribui em futuros estudos para o desenho apropriado de intervenções imunológicas em pacientes e da produção de vacinas.

**Palavras-chave:** Leishmaniose Tegumentar Americana. Linfócitos T. NKT. NK. Citometria de fluxo.

## ABSTRACT

American Cutaneous Leishmaniasis (LTA) is a neglected disease with a worldwide distribution, which affects mainly the populations of lower socioeconomic status. In Brazil, its distribution is heterogeneous, being observed in all states, and in Pernambuco, it is an endemic disease. Its clinical manifestations vary, and the cutaneous form is the main common form. The immune response developed by the host plays an important role in the clinical cure of the disease or in its progression, and T lymphocytes as well as NK cells are fundamental because they are sources of cytokine and because they act on the immediate immune response to the infection. Therefore, the objectives of this study were to characterize the patients in the clinical, epidemiological and laboratory aspects, to identify in the peripheral blood of patients with ACL, NK and NKT cells, CD8+ and CD4+ T lymphocytes and associate the phenotypic profile observed with the clinical evolution of the patients. Immunophenotyping was done by flow cytometry, evaluating the molecules on the surface of peripheral blood mononuclear cells of patients with an active disease, after the period of 72h of culture. The results of this work demonstrated that NK, NKT and CD8 + T cells were present in a larger quantity in the blood of these patients. Being important in the immediate immunity in ACL. In addition, it was seen that total antigen of *L. (V.) braziliensis* is able to induce a specific immune response by the patients with ACL in the initial periods of infection, and that the balance between cells of innate and adaptive immunity contributes to the disease protection. The study showed that the immune response developed by the host in the LTA is dynamic and contributes to future studies for the appropriate design of immunological interventions in patients and vaccines.

**Keywords:** American cutaneous leishmaniasis. T lymphocytes. NKT. NK. Flow cytometry.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Distribuição Mundial de casos de Leishmaniose Tegumentar, 2013.....	19
Figura 2- Gráfico de distribuição dos casos notificados de Leishmaniose Tegumentar Americana no estado de Pernambuco, no Período de 2002 a 2012.....	19
Figura 3- Diversidade de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> em três municípios (Amaraji, Moreno e Paudalho) de Pernambuco. A área geográfica Regiões descritas (RMR: Região Metropolitana de Recife; ZM: Zona da Mata; A: Agreste; S: Sertão; SSF: Sertão do São Francisco.).....	20
Figura 4- Formas evolutivas de <i>Leishmania spp.</i> Caracterização das formas evolutivas de <i>Leishmania (Viannia) brasiliensis</i> , em (A) sua forma promastigota em meio extracelular e (B) a forma amastigota do parasito no interior de macrófagos.....	21
Figura 5- Ciclo de Infecção de <i>Leishmania spp.</i> .....	22
Figura 6- Formas Clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana.....	24
Figura 7- Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana.....	26
Figura 8- Sub-populações de linfócitos T. Figura ilustrativa sobre a maturação de linfócitos T no Timo.....	32
Figura 9- Estratégia de análise para identificação de células NK. A) região linfocitária; B) Dot plot para CD56 x CD16; C) Histograma para CD8.....	42
Figura 10- Estratégia de análise para identificação de células NK e NK T. A) região linfocitária; B) Histograma para CD3; C) Dot plot para CD56 x CD16;	

E e G) Histograma para CD8.....	43
Figura 11- Estratégia de análise para identificação de linfócitos B CD19 <sup>+</sup> (A) e linfócitos T CD4 (B) <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> (C).....	43
Figura 12 - Estratégia de análise para identificação de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> (B) e CD8 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> (C). A letra A representa a região linfocitária.....	44
Figura 13 - Comparação de frequência de células CD56 <sup>+</sup> /CD16 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> em culturas de pacientes AT e grupo controle. Sem a presença de estímulo com Antígeno de <i>Leishmania braziliensis</i> . ....	52
Figura 14 - Comparação de frequência de células NKT (A) e NK (B) em culturas de pacientes AT e grupo controle. Sem a presença de estímulo com Antígeno de <i>Leishmania braziliensis</i> . ....	52
Figura 15 - Comparação de frequência de células NKT, em cultura de células submetidas a presença do estímulo com antígeno total de <i>Leishmania braziliensis</i> . ....	53
Figura 16 - Em (A) comparação de frequência de células NKT/CD8 <sup>-</sup> , e em (B) comparação de frequência de células NKT/ CD8 <sup>+</sup> , em cultura de células submetidas a presença do estímulo com antígeno total de <i>Leishmania braziliensis</i> . ....	54
Figura 17 - Em (A) comparação de frequência de células CD56 <sup>+</sup> /CD16 <sup>+</sup> , e em (B) comparação de frequência de células CD56 <sup>+</sup> /CD16 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> , em cultura de células submetidas a presença do estímulo com antígeno solúvel de <i>Leishmania braziliensis</i> . ....	55
Figura 18 - Em (A) comparação de frequência de células CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> , e em (B) comparação de frequência de células CD4 <sup>+</sup> /CD45 <sup>+</sup> , em cultura de	

células submetidas a presença do estímulo com antígeno solúvel de <i>Leishmania</i> spp. ....	56
Figura 19 - Comparação entre a porcentagem de células NKT, no sangue periférico de pacientes com LTA, com tempo de evolução da doença menor e maior de que 60 dias. Em (A) cultura células cultivadas sem estímulo de antígeno total de <i>Leishmania braziliensis</i> e em (B) células submetidas à estímulo com antígeno total de <i>Leishmania braziliensis</i> . ....	57
Figura 20 - Porcentagem de células T CD8+, presentes em cultura celular de pacientes com LTA após o estímulo com antígeno total de <i>Leishmania brasiliensis</i> .....	58
Figura 21 - Porcentagem de células NKT, em cultura de PBMC de pacientes com LTA. Comparação entre a grupos de pacientes com diferentes números de lesões teciduais. ....	59
Figura 22 - Em (A) porcentagem de células T CD8+, em cultura de PBMC de pacientes com LTA. Em (B) porcentagem de células T CD4+/CD8+, em cultura de PBMC. Comparação entre a grupos de pacientes com diferentes números de lesões teciduais.....	59

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Lista de anticorpos monoclonais utilizados nos ensaios de citometria de fluxo .....	45
Tabela 2- Comparação entre os dados socioeconômicos, clínicos e laboratoriais dos pacientes com lesões cutâneas típicas antes do tratamento quimioterápico (AT). .....	48
Tabela 3- Resultado dos testes laboratoriais do grupo de pacientes estudados. ....	49

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Fluorocromo Alofococianina
CD	Cluster differentiation (Grupamento de diferenciação)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (Ensaio imunoenzimático)
FITC	Fluorocromo Isotiocianato de fluoresceína
FL	Canal de Leitura de Fluorescência
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IFI	Reação de imunofluorescência indireta
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
IL	Interleucina
LC	Leishmaniose cutânea
LM	Leishmaniose mucosa
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
MHC	Major Histocompatibility complex (Complexo principal de histocompatibilidade)
MS	Ministério da Saúde
NK	Natural Killer (Células exterminadoras naturais)
OMS	Organização mundial da saúde
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell (Células mononucleares do sangue periférico)
PBS	Phosphate Buffered Saline (Salina tamponada com fosfato)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)
SINAN	Sistema de informação de agravo e notificação
TA	Temperatura ambiente
Th	T helper (Linfócito T auxiliar)
TNF	Tumor Necrosis Factor (Fator de necrose tumoral)
WHO	World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRAFICA</b> .....	<b>18</b>
3.1 ASPECTOS GERAIS DAS LEISHMANIOSES.....	18
3.2 FORMAS CLÍNICAS NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA .....	22
3.3 DIAGNÓSTICO NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA .....	24
3.4 TRATAMENTO.....	26
3.5 RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA .....	29
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>38</b>
4.1 TIPO DO ESTUDO .....	38
<b>4.1.1 População do estudo</b> .....	<b>38</b>
<b>4.1.2 Exames laboratoriais de avaliação dos pacientes</b> .....	<b>39</b>
<b>4.1.3 Considerações éticas</b> .....	<b>39</b>
4.2 OBTENÇÃO DE ANTÍGENO TOTAL DE <i>L. BRAZILIENSIS</i> .....	39
4.3 OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC) .....	40
4.4 CULTURA CELULAR .....	40
4.5 MARCAÇÃO EX VIVO DE LINFÓCITOS .....	41
4.6 ESTRATÉGIA DE ANÁLISE NA CITOMETRIA DE FLUXO .....	41
4.7 ANTICORPOS MONOCLONAIS UTILIZADOS NAS MARCAÇÕES POR CITOMETRIA DE FLUXO .....	44
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	45
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>47</b>
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA .....	47
5.2 ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE .....	51

<b>5.2.1</b> Percentagem de Células Mononucleares do sangue Periférico, após período de cultura celular com e sem estimulação com antígeno total de <i>Leishmania braziliensis</i> .....	<b>51</b>
<b>5.2.2</b> Percentagem de Células Mononucleares do sangue Periférico, de pacientes com período de evolução da doença menor e maior que 60 dias após período de cultura celular .....	<b>56</b>
<b>5.2.3</b> Percentagem de Células Mononucleares do sangue Periférico, de pacientes com período de evolução da doença menor e maior de 60 dias após período de cultura celular.....	<b>58</b>
<b>6</b> DISCUSSÃO .....	<b>60</b>
<b>7</b> CONCLUSÕES .....	<b>67</b>
<b>8</b> PERSPECTIVAS .....	<b>68</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>69</b>
<b>APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO PACIENTE.....</b>	<b>75</b>
<b>APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – PACIENTE MENOR QUE 18 ANOS.....</b>	<b>77</b>
<b>APÊNDICE C - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO CONTROLE.....</b>	<b>79</b>
<b>ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA.....</b>	<b>81</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é um problema de saúde pública, que afeta a produtividade e a saúde das pessoas. Considerada uma doença negligenciada, acomete principalmente pessoas com menor *status* socioeconômico de países menos desenvolvidos. É causada por diversas espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (TIUMAN *et al.*, 2011, BRITO *et al.* 2012).

A doença é transmitida ao homem pela picada de flebótomos infectados e apresenta manifestações clínicas variadas, que dependem de um conjunto de fatores que incluem a susceptibilidade do hospedeiro, cepa do parasita e quantidade de espécimes inoculadas. São manifestações cutâneas que variam desde pequenos nódulos até a destruição das mucosas, sendo as formas cutâneas as mais comuns (GOTO; LINDOSO, 2010; TIUMAN *et al.*, 2011; KEVRIC *et al.*, 2015).

O diagnóstico envolve aspectos epidemiológicos, avaliação clínica e exames laboratoriais. O tratamento é feito com antimoniais pentavalentes. No Brasil, a droga de primeira escolha é o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®), e outras drogas considerada de segunda escolha como a anfotericina B. O objetivo da quimioterapia é a eliminação dos parasitas através da sua destruição direta e a resposta imune é a chave para o sucesso (AMEEN, 2010; GOTO; LINDOSO, 2010)

A imunidade contra a *Leishmania* spp. é mediada por uma complexa rede de parâmetros imunológicos, que incluem a resposta imune inata e adaptativa (DUTHIE *et al.*, 2012, GOLLOB *et al.*, 2014; KEDZIERSKI; EVANS 2014). Juntas, desempenham um importante papel na cura clínica da doença ou na sua progressão (SOUZA *et al.*, 2013). Dessa maneira, a presença de células efetoras, como macrófagos, células NK, linfócitos B, Linfócitos T, assim como de citocinas, e anticorpos específicos é crítica para o controle ou desenvolvimento da leishmaniose (CECILIO *et al.*, 2014; KEDZIERSKI; EVANS 2014; OGHUMU *et al.*, 2010).

Sendo assim, os estudos imunológicos são indispensáveis para descrever os mecanismos de defesa e ajudar no desenvolvimento de efetivas estratégias de combate ao parasita.

A resposta linfocitária na LTA é caracterizada principalmente pelo aumento de células T CD4<sup>+</sup>, onde estão bem descritos o direcionamento para um perfil de citocinas

dos tipos Th1 ou Th2 (BRELAZ-DE-CASTRO *et al.*, 2012; KEDZIERSKI, 2010). Na leishmaniose humana, o padrão de resposta imune do tipo Th1 com produção de citocinas como IFN- $\gamma$  e TNF tem sido associado com a ativação macrofágica e destruição parasitária, enquanto os mecanismos de morbidade estão associados com citocinas do perfil Th2 como IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$  (SOUZA, 2015; BRELAZ-DE-CASTRO *et al.*, 2012; GOLLOB *et al.*, 2014). No entanto, essa dicotomia (Th1xTh2) é uma simplificação da resposta imune, que é mais complexa e envolve outros subtipos de células T.

Portanto, através da citometria de fluxo, este trabalho pretende caracterizar células do sistema imunológico e subtipos de células T no contexto *ex vivo*, além de avaliar a produção sérica de citocinas em amostras de pacientes. Trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa mostraram uma associação entre os perfis de linfócitos T e de suas citocinas com a cura e progressão da doença. Neste trabalho, avaliamos a resposta de diferentes células da resposta imune de pacientes com LTA e relacionamos esses aspectos com o tratamento e características clínicas dos pacientes.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Associar os aspectos clínicos e imunológicos envolvidos na cura e/ou progressão da doença em pacientes com leishmaniose tegumentar americana.

### 2.2 ESPECÍFICOS

1. Caracterizar os pacientes quanto aos aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais;
2. Identificar no sangue periférico de pacientes com LTA, durante o tratamento e após cura clínica as células NK e NKT, linfócitos T C8+ e T CD4+;
3. Associar o perfil fenotípico observados com a evolução clínica dos pacientes.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 ASPECTOS GERAIS DAS LEISHMANIOSES

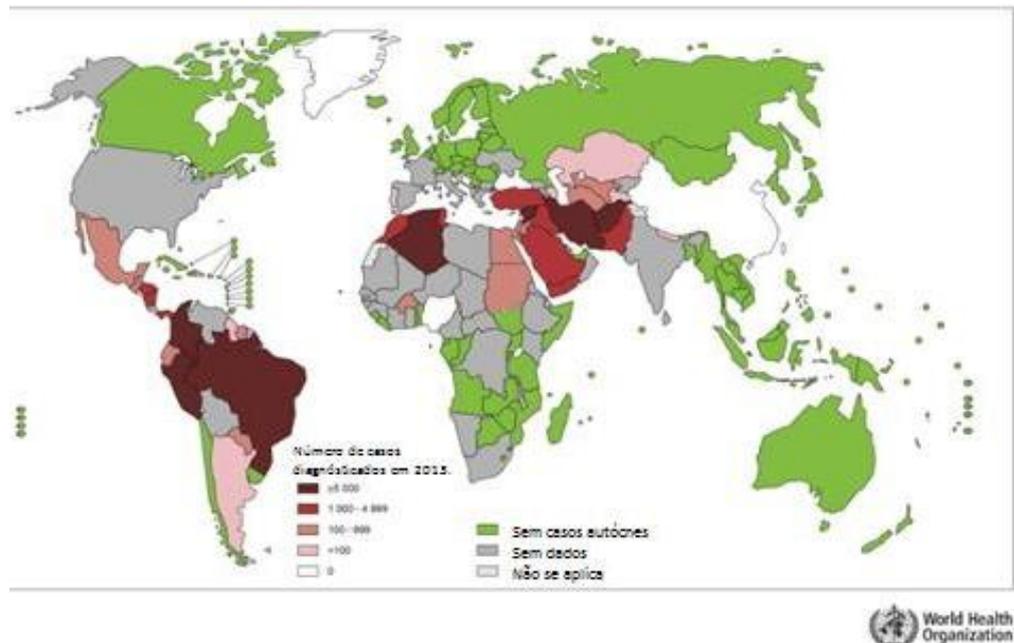
As Leishmanioses são consideradas um conjunto de doenças infecto-parasitárias de grande relevância clínica e epidemiológica (BRASIL, 2010; NEVES, 2011; FERREIRA, 2014). Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram uma incidência de aproximadamente 12 milhões de casos diagnosticados todos os anos, e que pelo menos 350 milhões de pessoas estão susceptíveis a adquirir a infecção, especialmente nas Américas (Central e do Sul) e África (ALVAR *et al.*, 2012). Devido ao seu caráter antroponótico e por afetar principalmente a parcela mais pobre da população mundial, as leishmanioses são consideradas doenças negligenciadas e de difícil controle, o que as faz um problema de saúde pública (GOTO; LINDOSO, 2010; TIUMAN *et al.*, 2011, BRITO *et al.* 2012).

Essa infecção apresenta diferentes manifestações clínicas no hospedeiro humano, que dependem da associação de alguns fatores como a espécie e a linhagem do agente etiológico, quantidade de espécimes inoculadas pelo flebotomíneo, estado nutricional e resposta imunológica do hospedeiro (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2010). As infecções por *Leishmania* spp são divididas em dois grandes grupos, o das Leishmanioses Viscerais e o grupo das Leishmanioses Tegumentares (BRITO *et al.*, 2012).

As Leishmanioses Tegumentares apresentam ampla distribuição espacial (Figura 1). Nas Américas ocorrem desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. Por causa dessa distribuição, recebem a denominação de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) (GONTIJO; CARVALHO, 2003; ALVAR *et al.*, 2012).

Atualmente, estima-se que seis países respondam por cerca de 90% de todas as ocorrências mundiais da doença, entre eles o Brasil. De acordo com o Ministério da Saúde (MS), no ano de 2015 mais de 19.000 mil novos casos de LTA foram diagnosticados no país (BRASIL, 2010). O Nordeste brasileiro representa cerca de 36% desse total. Pernambuco é um dos estados mais afetados, com uma incidência anual de 400 novos casos (Figura 2) (SINAN, 2016).

**Figura 1-** Distribuição Mundial de casos de Leishmaniose Tegumentar, 2013



Fonte: World Health Organization, WHO 2015

**Figura 2-** Gráfico de distribuição dos casos notificados de Leishmaniose Tegumentar Americana no estado de Pernambuco, no Período de 2002 a 2012.



O agente etiológico da LTA são parasitas intracelulares, pertencentes à família Trypanosomatidae, de diferentes espécies do gênero *Leishmania* (AMEEN, 2010; BRITO *et al.*, 2012). No Brasil a grande variabilidade climática e geográfica, além do processo crescente de urbanização determinou uma distribuição heterogênea de espécies de *Leishmania* spp. Atualmente seis espécies estão associadas com a LTA no homem, das quais uma representa o subgênero *Leishmania* e cinco pertencem ao subgênero *Viannia*. A *Leishmania (Viannia) braziliensis* é a principal espécie responsável pela LTA no país e no estado de Pernambuco (Figura 3). (BRITO *et al.*, 2009; GOTO; LINDOSO, 2010; CARVALHO, 2012 ; DANTAS, 2017).

**Figura 3-** Diversidade de *Leishmania (Viannia) braziliensis* em três municípios (Amaraji, Moreno e Paudalho) de Pernambuco. A área geográfica Regiões descritas (RMR: Região Metropolitana de Recife; ZM: Zona da Mata; A: Agreste; S: Sertão; SSF: Sertão do São Francisco.)

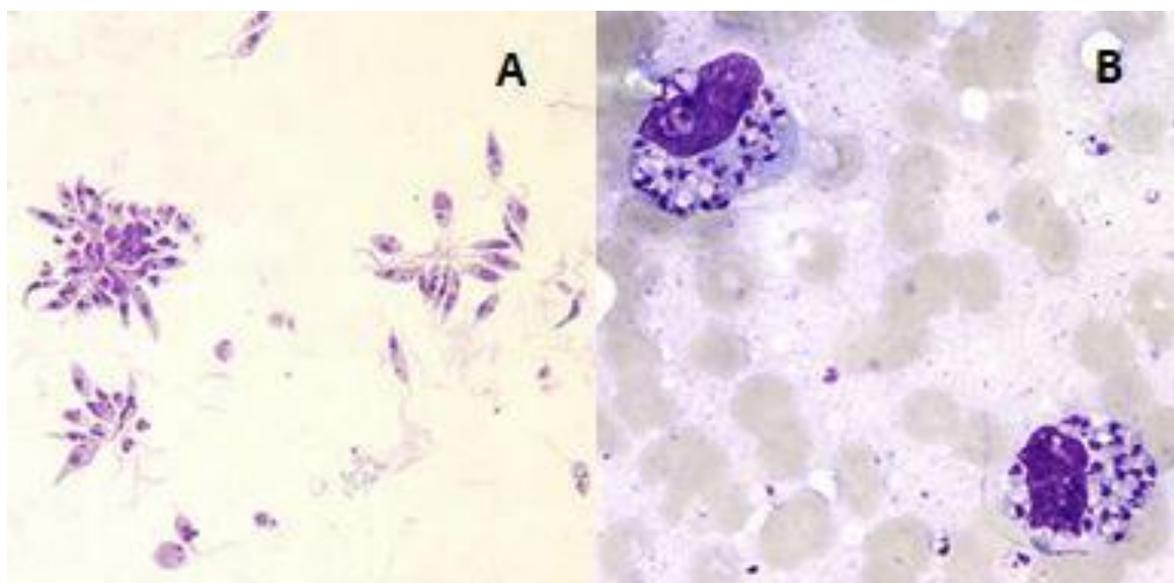


**Fonte:** BRITO *et al.*, 2012

A transmissão ocorre através de insetos da ordem Díptera, Gênero *Lutzomyia*, denominados flebotomíneos. Durante o repasto sanguíneo, a fêmea infectada inocula no hospedeiro as formas infecciosas e flageladas do parasita denominadas promastigotas metacíclicas (Figura 4- A) (ALECRIM, 2014; BRELAZ *et al.*, 2012; GUIMARÃES *et al.*, 2012).

Uma vez dentro da corrente sanguínea/ vasos linfáticos essas formas são fagocitadas por células do sistema mononuclear do hospedeiro vertebrado, onde se alojam e diferenciam-se em formas arredondadas chamadas amastigotas (Figura 4-B).

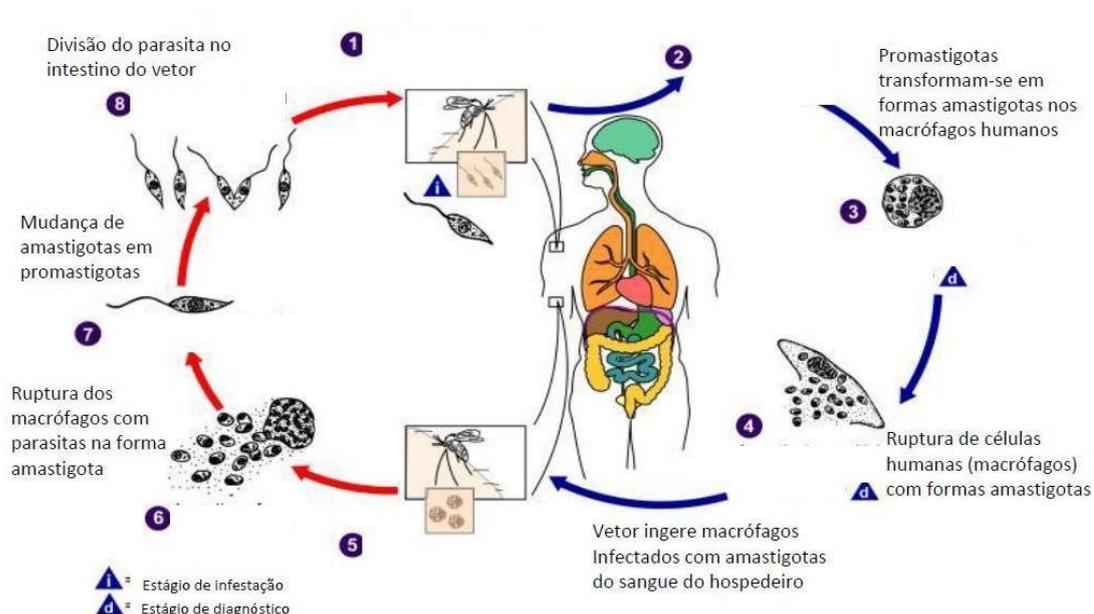
**Figura 4-** Formas evolutivas de *Leishmania spp.* Caracterização das formas evolutivas de *Leishmania (Viannia) brasiliensis*, em (A) sua forma promastigota em meio extracelular e (B) a forma amastigota do parasito no interior de macrófagos.



**Fonte:** BRASIL, 2007.

No interior dessas células o parasita se reproduz de forma assexuada, por divisão binária, até rompê-las. As formas amastigotas liberadas na corrente sanguínea podem infectar novas células mononucleares gerando, dessa maneira o dano tecidual, ou podem ser ingeridas por um novo flebotomíneo dando início a um novo ciclo de infecção (Figura 5) (BARROS, *et. al.*, 2012; GUIMARÃES *et.al.*, 2012)

**Figura 5-** Ciclo de Infecção de *Leishmania* spp.



Fonte: Adaptado de Fonte: DPDx - Centers for disease Control and Prevention, 2017

### 3.2 FORMAS CLÍNICAS NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

A apresentação clínica da LTA exhibe polimorfismo significativo, e o espectro de gravidade dos sinais e sintomas também é bastante variável. Na maior parte dos casos é possível caracterizar a doença por meio do surgimento de lesões ulcerativas no tegumento, que se iniciam no ponto de inoculação das formas infectantes (GOTO; LINDOSO, 2010).

Outros aspectos ligados ao hospedeiro como susceptibilidade, estado imunológico e fatores genéticos, mostram uma correspondência significativa entre as distintas apresentações clínicas da doença (OLIANI, 2012; HOZANNAH, 2013).

Embora as formas cutâneas simples sejam mais comuns, as lesões podem variar desde pequenos nódulos até a destruição e mutilação das mucosas e tecidos cartilagosos (AMEEN, 2010; OLIANI, 2012). Portanto é possível classificar a LTA de acordo com as suas manifestações (BRASIL, 2010).

A leishmaniose cutânea (LC) configura a alteração tecidual mais frequente, cujo

período de incubação pode variar de dias a meses até o surgimento dos primeiros sinais (GOTO; LINDOSO, 2010; MACEDO *et al.*, 2012). Nesse tipo de apresentação nota-se inicialmente uma pápula no sítio de inoculação que pode dar início à lesão. A perda tecidual é progressiva e a ferida formada tem características clássicas como: delimitação e elevação das bordas, formato ovalado ou arredondado, base eritematosa e leito granuloso (Figura 6-A) (GOTO; LINDOSO, 2010). A associação de infecções bacterianas pode causar dor local e produzir exsudato seropurulento que, ao dessecar-se em crostas, recobre total ou parcialmente o fundo da úlcera, modificando seu aspecto (BRASIL, 2010; GOMES *et al.*, 2014).

A forma mucocutânea (MC) é a forma mais agressiva da doença. As lesões infiltrativas degeneram tecidos cavitários como fossas nasais, laringe, faringe e esôfago fazendo com que as funções desses órgãos sejam comprometidas (Figura 6-B). A destruição dos tecidos nasais por exemplo, leva o paciente a apresentar sintomas clínicos como sangramento nasal intermitente, obstrução de fossas nasais, além de edemas e ulcerações (Figura 6- C). Cerca de 42% dos pacientes ainda apresentam perfuração de septo nasal. A forma MC pode surgir meses ou até anos após o aparecimento de lesão cutânea inicial (GOTO; LINDOSO, 2010; MACEDO *et al.*, 2012). Essa manifestação clínica apresenta baixa carga parasitária e, quando não tratada, oferece risco de deformidade permanente (AMEEN, 2010; NUNES *et al.*, 2012).

A Leishmaniose mucosa (LM) ainda pode levar à destruição das cordas vocais (Figura 6- D), comprometimento de tonsilas palatinas, úvula, levando o paciente a desenvolver disfagia e odinofagia com conseqüente emagrecimento. Nos exames laboratoriais diagnósticos esses pacientes apresentam resposta positiva à IDRM e à resposta linfoproliferativa *in vitro* de células do sangue periférico, frente ao antígeno. A magnitude desta resposta é geralmente maior que aquela verificada na forma localizada (PALMEIRO *et al.*, 2012; COSTA, 2014).

Outra forma clínica encontrada é a leishmaniose cutânea difusa (LCD) que se caracteriza pelo surgimento de pápulas ou nódulos. Essa manifestação é considerada a mais rara e severa, cujas lesões podem persistir por período de tempo indeterminado. *Leishmania (L.) amazonensis* é a espécie causadora dessa forma clínica (AMEEN, 2010; NUNES *et al.*, 2012) (Figura 6- E). Quando realizada biópsia

tecidual é possível encontrar grandes quantidades do parasita nas lesões que apresenta resposta quase sempre insatisfatória ao tratamento (GOTO; LINDOSO, 2010; MACEDO *et al.*, 2012).

**Figura 6-** Formas Clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana



**Fonte:** BRASIL, 2007. Formas clínicas da LTA. Em (A) Leishmaniose Cutânea (LC), (B) Leishmaniose Mucocutânea (LMC), em (C) Leishmaniose Mucosa na Cavidade nasal crostas obstruindo fossa nasal; (D) Laringe: lesão infiltrativa em pregas vocais; (E) Leishmaniose Cutânea Difusa.

### 3.3 DIAGNÓSTICO NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

Atualmente o diagnóstico da LTA está apoiado na associação entre aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais (Figura 7) (AMEEN, 2010). O exame clínico é composto pela anamnese e pela observação das características das lesões apresentadas. (GOTO; LINDOSO, 2010). É nesse momento que também são coletadas importantes informações, cruciais para identificação da doença como a existência de casos de LTA na região, a frequência de cães e/ou outros mamíferos nas proximidades com lesões de pele e mucosa, a inserção do paciente em áreas florestais e possíveis acidentes de trabalho envolvendo materiais perfuro cortantes contaminados com sangue (OLIVEIRA *et al.*, 2013)

A utilização de métodos de diagnóstico laboratorial visa não somente a confirmação dos achados clínicos, mas garante oferecer informações importantes sobre os aspectos epidemiológicos da doença, auxiliando dessa maneira no controle desse agravo (BRASIL, 2010). A sensibilidade de cada método de diagnóstico pode variar de acordo com a experiência de cada serviço, a qualidade do equipamento e dos insumos utilizados, o tempo de evolução das lesões e as formas clínicas apresentadas. (DANTAS, 2014)

O diagnóstico laboratorial da leishmaniose se constitui fundamentalmente de três grupos de exames: Parasitológicos, Imunológicos e Moleculares.

Exames parasitológicos tem como base a identificação e a visualização de formas evolutivas do parasita em tecidos e fluidos do hospedeiro. Em algumas situações, como em casos onde não há possibilidade de confirmação por outros métodos, esse tem sido considerado o padrão ouro no diagnóstico dessa doença (OLIVEIRA *et al.*, 2013, MARTINS, 2014). Porém, vale ressaltar que nem sempre o material coletado apresenta espécimes parasitários. A literatura descreve que, a probabilidade de identificação parasitária é inversamente proporcional ao tempo de evolução da doença, sendo rara essa identificação após um ano do aparecimento das primeiras lesões. Infecções secundárias também contribuem para diminuir a sensibilidade desse método. Além do mais, é necessário que hajam profissionais treinados para coletar amostras de tecidos ou aspirados da lesão e identificar os parasitas por meio da microscopia (MUTISO *et al.*, 2013; DANTAS, 2014).

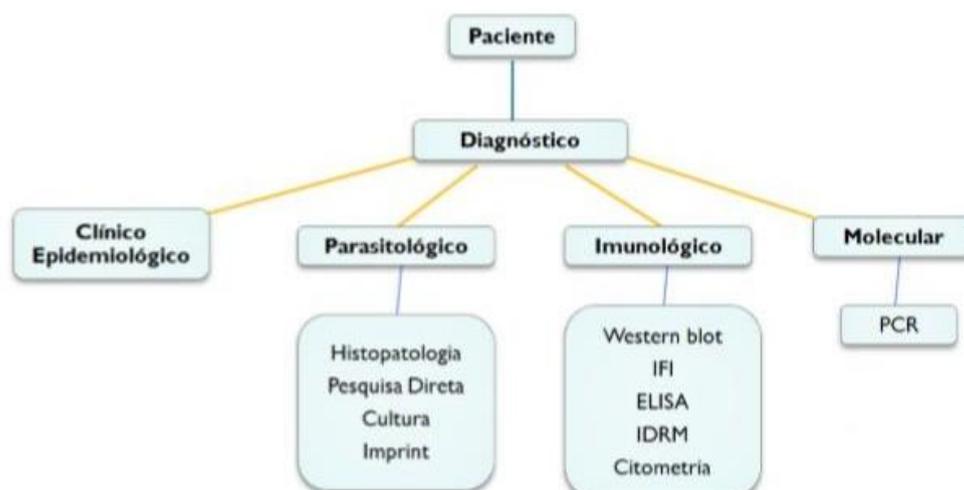
O diagnóstico molecular representado pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), é um método que vem sendo amplamente utilizado para fins de pesquisa, mas que ainda tem baixa representatividade na rotina de diagnósticos, por necessitar de mão de obra especializada e esforços financeiros para sua execução. Pouco utilizado, porém apresenta alta sensibilidade e especificidade (GOTO; LINDOSO, 2010).

Os testes imunológicos, como a imunofluorescência indireta (IFI), o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) e o Western Blot, são importantes estratégias no diagnóstico da LTA, porém não conseguem relacionar os níveis de anticorpos circulantes com o estágio da doença, além de apresentar a possibilidade de reações cruzadas com outros tripanosomatídeos (EIDSMO, 2012; SANTOS; BRODSKYN, 2014).

A intradermoreação de Montenegro (IDRM) é uma alternativa muito utilizada, mas os relatos de casos falso-negativos em pacientes imunodeprimidos, com lesões recentes ou em período de incubação da doença, e casos de falso-positivo pacientes previamente sensibilizados, por residirem em áreas endêmicas sem necessariamente estarem infectados, deixam brechas no diagnóstico (NYLEEN; GAUTAM, 2010; SOUZA *et al.*, 2013; BENTES, 2015).

Atualmente a citometria de fluxo vem sendo considerada uma possibilidade para o diagnóstico da LTA. Rocha e colaboradores (2006) destacam que essa técnica permitiu a análise quantitativa de anticorpos, e a distinção dos casos de leishmaniose tegumentar e leishmaniose visceral, além de diagnosticar com precisão a Tripanossomíase Americana em áreas onde essas doenças coexistem (ROCHA *et al.*, 2006; MARTINS, 2014). No mais a técnica permite avaliar o estágio da infecção e monitorar a eficácia do tratamento demonstrando ser uma excelente alternativa para se avaliar o critério de cura na LTA (OLIVEIRA, 2013).

**Figura 7-** Diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana



Fonte: BRELAZ DE CASTRO, 2013

### 3.4 TRATAMENTO

O tratamento para a leishmaniose há mais de 50 anos tem como base o uso de

antimoniais pentavalentes ou drogas consideradas de segunda escolha, como a anfotericina B e a Pentamidina, que visam acelerar a cura, diminuir as cicatrizes e o risco de disseminação da doença (AMEEN, 2010; GOTO; LINDOSO, 2010).

As drogas de primeira escolha são os antimoniais pentavalentes ( $Sb^{+5}$ ). Há dois tipos de antimoniais que podem ser utilizados para o tratamento da LTA, o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostan®), sendo este último não comercializado no Brasil devido à evidências que comprovaram sua alta toxicidade (OLIVEIRA, 2013; GONÇALVES, 2014).

Esses medicamentos funcionam interferindo na bioenergética das formas amastigotas. Dentro da célula processos de oxidação de ácidos graxos e glicólise são inibidos causando diminuição na produção de ATP e GTP, moléculas essenciais à sobrevivência do parasita. (BRASIL, 2014; GONÇALVES, 2014)

A via de administração é preferencialmente endovenosa visto que, no organismo, a droga não consegue se ligar aos eritrócitos, o que aumenta sua disponibilidade plasmática que gira em torno de 95%. Sua metabolização acontece no fígado e sua excreção acontece por via renal (SALDANHA *et.al.*, 2000; BRASIL, 2007; BRASIL, 2015).

Com o objetivo de padronizar o esquema terapêutico, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que a dose de Glucantime® seja calculada em mg  $Sb^{+5}/kg/dia$ . Seguindo essas recomendações, no Brasil, o Ministério da Saúde disponibiliza cartilhas que auxiliam os profissionais de saúde nesse cálculo. Dessa maneira fica estabelecido que a dose para adultos deve variar de 10 a 20 mg  $Sb^{+5}/kg/dia$  um período de 15 a 20 dias, não podendo ultrapassar a dose de 15 ml dia ou 3 ampolas o medicamento (SALDANHA *et.al.*, 2000; BRASIL, 2015). Para pacientes com co-infecção pelo vírus do HIV a dose deve ser ajustada para 15mg/kg/dia, com monitoramento semanal e não se trata da droga de primeira escolha. Gestantes não podem fazer uso do Glucantime® já que esse fármaco apresenta grande potencial citotóxico e teratogênico, atravessa facilmente a barreira placentária, chegando ao feto e causando graves problemas em seu desenvolvimento (BRASIL, 2007; BRASIL,2014; BRASIL, 2015).

Apesar de amplamente utilizada, o antimoniato de N-metilglucamina apresenta

efeitos colaterais bastante acentuados como artralgia, mialgia, anorexia, náuseas, vômitos, febre e, em casos mais graves, choque pirogênico, pancreatite e insuficiência renal aguda (IRA) (AMEEN, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2011; DUQUE *et. al.*, 2016).

Para grupos como gestantes e portadores do vírus do HIV a Anfotericina B é uma das drogas considerada como primeira escolha para o tratamento da LTA. (AMEEN, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2011).

O desoxicolato de Anfotericina B é um antibiótico poliênico com excelente atividade na destruição de *Leishmania* spp. intra e extracelular. Essa droga atua nas formas promastigotas e amastigotas do parasita e apresenta toxicidade seletiva por sua interferência nos ésteres da membrana citoplasmática de *Leishmania* spp. A dose recomendada é de 1 mg/kg/dia em dias alternados, sem que se ultrapasse a dose de 50 mg em cada aplicação (AMEEN, 2010; BRASIL, 2014; DUQUE *et. al.*, 2016).

Devido aos seus efeitos colaterais seu uso é restrito a ambientes hospitalares. Sendo realizado o monitoramento semanal por meio de eletrocardiografia e exames laboratoriais de enzimas hepáticas e testes de função renal. Dentro dos efeitos adversos mais comuns estão febre, náuseas, vômitos, hipopotassemia e flebite no local da infusão. Sua utilização é contra-indicada em pacientes cardiopatas, hepatopatas e, especialmente, nefropatas (BUTSCH *et al.*, 2012, GONÇALVEZ, 2014; BRASIL, 2015).

Visando amenizar as reações adversas dessa droga, foi desenvolvida uma formulação lipossomal da anfotericina B. Esse fármaco tem eficiência similar e é significativamente menos tóxico. A anfotericina B é incorporada dentro de lipossomas feitos com fosfatidilcolina, colesterol e disterolfosfatidilglicerol. No Brasil é administrada apenas no tratamento das formas muco-cutânea e visceral da leishmaniose, mas apresenta boa eficácia no tratamento da forma cutânea localizada (SOLOMON *et al.*, 2010; BUTSCH *et al.*, 2012). Essa versão da droga pode ser utilizada na leishmaniose tegumentar nos casos em que todas as demais opções terapêuticas tenham sido utilizadas sem sucesso ou contra-indicadas.

As pentamidinas, outra alternativa para o tratamento das leishmanioses, é uma droga menos potente, utilizada na dose de 4 mg/Kg/dia, por via intramuscular ou endovenosa. Atua ligando-se a ácidos nucléicos e DNA dos protozoários, causando

diversos efeitos incluindo a inibição da síntese de DNA e RNA. Esse medicamento é menos tóxico que os supracitados, mas interfere no metabolismo da glicose, podendo levar os pacientes à hiper ou hipoglicemia severas, durante ou logo após a sua administração, inflamações cardíacas além de ter um grande potencial nefrotóxico (BRITO, 2012. BRASIL, 2015).

Mesmo após o tratamento completo, o critério de cura para leishmaniose é basicamente clínico, definido pela reepitelização das lesões, diminuição do processo inflamatório e o monitoramento para avaliar a reabertura das úlceras (por 12 meses), o que pode caracterizar falha no tratamento (TIUMAN *et al.*, 2012).

Ainda existem lacunas sobre os mecanismos de atuação dos fármacos no organismo humano, e os efeitos adversos provenientes das medicações são uma barreira para a adesão ao tratamento (TIUMAN *et al.*, 2012). Nessa perspectiva, conhecer o papel da resposta imune no controle e progressão dessa infecção abre portas para o desenvolvimento de tratamentos eficazes como a imunoterapia e as imunizações (EVANS, 2014).

### 3.5 RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

A resposta imunológica desenvolvida na infecção por *Leishmania* spp. é um processo dinâmico e complexo que envolve interações entre diversas células do sistema imune inato (macrófagos, neutrófilos, células NK.) e adaptativo (Linfócitos B e T) levando a uma ativação específica da resposta imunológica por parte do hospedeiro (DA-CRUZ *et al.*, 2005, OLIVEIRA, 2016). As células e moléculas envolvidas nesse processo desempenham um papel importante durante a infecção, e estão diretamente ligadas ao controle ou progressão da doença (ALMEIDA, 2013).

Ainda que alguns mecanismos de infecção permaneçam obscuros, estudos revelam que o parasita faz uso de diversas estratégias para se evadir do sistema de defesa do hospedeiro. Após a entrada das promastigotas no tecido, células fagocíticas são recrutadas até o sítio de infecção. Os neutrófilos são as primeiras células a chegarem e são também as primeiras a serem infectadas por *Leishmania* spp (ROCHA, 2014). Cada neutrófilo infectado serve como uma passagem direta do parasita até o interior dos macrófagos (PIRES, 2012).

Normalmente, os neutrófilos possuem um tempo curto de vida, em torno de 6h, no entanto ao serem contaminadas os parasitas presentes em seu interior inibem o processo de apoptose da célula, aumentando seu tempo de vida (PIRES, 2012). Após 18h, o processo de morte celular inicia, é o que pode ser chamado de apoptose tardia. É nesse período de tempo que chegam ao local da infecção macrófagos. Estes macrófagos, fagocitam os neutrófilos mortos através do reconhecimento do complexo de fosfatidilserina (PS) exposto na superfície da célula. Esse tipo de fagocitose facilita a entrada de parasitas viáveis, de forma silenciosa, no interior dos macrófagos predispondo a infecção (BIRNBAUM; CRAFT, 2011; NASCIMENTO, 2012).

Outro fator relevante é a capacidade das promastigotas induzirem os neutrófilos a produzirem TGF- $\beta$ . Essa molécula é capaz de inibir as funções efetoras antimicrobianas dos fagócitos, contribuindo para a multiplicação parasitária (NASCIMENTO, 2012). AIREIS e colaboradores (2005), descreveram em seus estudos componentes da saliva do flebotomíneo [prostaglandinas, apirases e maxidilan (MAX)], capazes de proteger o parasita e aumentar seu poder de infectividade. Devido à sua ação vasodilatadora essas substâncias proporcionam a chegada de uma quantidade maior de células fagocíticas ao sítio de infecção, além de inibirem a produção de Óxido Nítrico (NO), molécula importante no combate e destruição de parasitas intracelulares (AIREIS, *et al.*; 2005, UZONNA, 2012).

Outros estudos indicam que as formas procíclicas e metacíclicas de *Leishmania* spp. conseguem, por meio de acoplamento com receptores de membrana (CR3) e glicoproteínas de superfície (gp63), ativar as vias clássica e alternativa do sistema complemento (BARROS, 2012). Essa ligação favorece a fagocitose pelos macrófagos, permitindo que o parasita inicie a multiplicação no interior do mesmo, além de inibir a produção de Interleucina-12 (IL-12). Essa interleucina é uma das principais citocinas

responsáveis pela ativação de linfócitos T-auxiliares e pela inibição da ação dos metabólitos do oxigênio (ex., o peróxido de hidrogênio) no interior dos fagócitos (ISNARD, 2012).

A maior parte dos conhecimentos de imunologia na LTA são provenientes dos estudos de infecções em modelos murinos, utilizando o modelo experimental de infecção com *Leishmania major*. Nessas infecções, a resposta imune é mediada predominantemente por linfócitos T.

Já está amplamente difundido o conceito de que a diferença entre resistência ou progressão da doença esteja associada ao nível de expansão de células com perfis Th1, (que apresentam produção de Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e estão associada à resposta imune celular) e Th2 (que produzem Interleucina-4 (IL-4) e estão associadas com a produção de anticorpos e à imunidade humoral (BACELLAR, 2002; SOUZA *et al.*, 2005; BRODSKY, 2014).

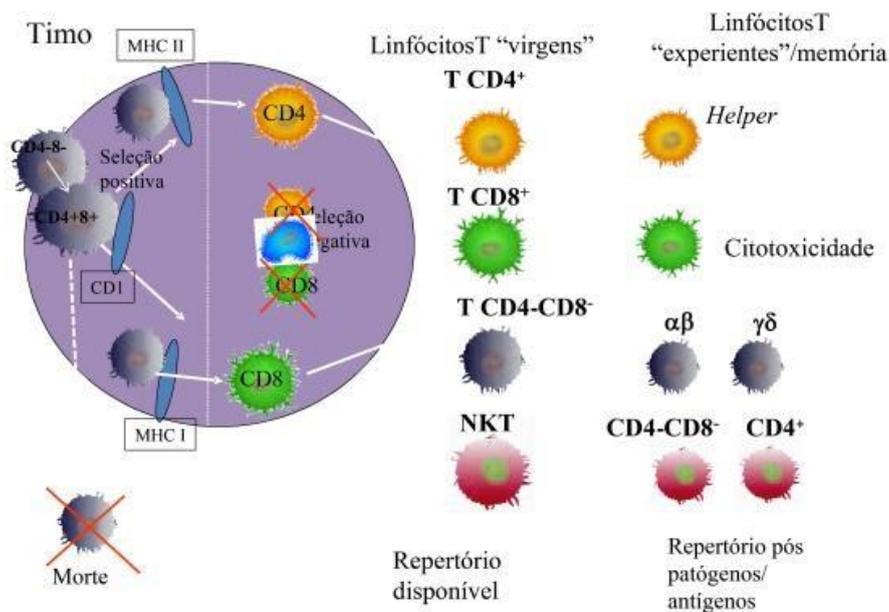
Experimentalmente, camundongos BALB/c apresentam susceptibilidade à infecção. Nesses animais, a ativação de linfócitos T com perfil Th2 e aumento na produção de IL-4 não conseguem controlar a multiplicação dos parasitas, que se proliferam rapidamente. Já os camundongos C57Bl/6, CBA, C3H são considerados resistentes à infecção, por apresentarem perfil predominantemente Th1, com aumento de produção de IFN- $\gamma$ . Contudo, é importante ressaltar que, em humanos, a interação parasita-hospedeiro vem mostrado ser muito mais complexa. Muitos estudos demonstram que diferentes grupos celulares, como linfócitos, macrófagos, neutrófilos e células Natural Killer (NK), apresentam grande relevância no enfrentamento dessa infecção (LYRA, 2013; BRELAZ-DE-CASTRO, 2012).

Há mais de duas décadas se aceita que na leishmaniose humana a imunidade é predominantemente mediada por linfócitos T. Dentro da resposta imune adaptativa os linfócitos T constituem uma população que pode se diferenciar em alguns subgrupos celulares com a finalidade de desempenhar diferentes funções (MOUGNEAU; BIHL; GLAICHENHAUS, 2011). Durante o seu desenvolvimento no timo, as células T desenvolvem um amplo repertório de receptores de antígenos, que são produzidos a partir de progenitores diferenciados (LIMA *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2013).

Os receptores antigênicos dos linfócitos T são extremamente variáveis nas suas especificidades, sendo assim, cada indivíduo é capaz de produzir respostas contra uma grande variedade de patógenos (LIMA et. al., 2010). Na figura 8 podemos observar as principais sub-populações de linfócitos T descritas até agora. Essas subpopulações são definidas a partir da expressão de moléculas em sua superfície como CD4 e CD8 e TCR alfa/beta e gama/delta duplo negativas, como também as células NK T (LYRA, 2013; CIANFERONI, 2014).

De maneira geral, a resposta imune adaptativa contra a leishmaniose é fortemente marcada pela expansão e diferenciação de células T CD4+ (MOUGNEAU; BIHL; GLAICHENHAUS, 2011; SOUZA et al., 2013). Algumas moléculas estão associadas com essa diferenciação. A interleucina-12 (IL-12), produzida por macrófagos e células dendríticas e o IFN- $\gamma$  produzido pelas células NK, e as células T previamente ativadas promovem o desenvolvimento de células com perfil Th1, enquanto que a IL-4 induz o desenvolvimento de células Th2.

**Figura 8-** Sub-populações de linfócitos T. Figura ilustrativa sobre a maturação de linfócitos T no Timo.



Fonte: Lima et. al, 2010

Sabe-se também que as células T CD4+ com perfil Th1 produzem IFN- $\gamma$  e fator de necrose tumoral (TNF) que estão diretamente ligados ao controle da infecção e diminuição da carga parasitária (TRANDEM *et al.*, 2011; CARVALHO, 2012, OLIVEIRA, 2013). No entanto, alguns estudos relacionam esse perfil (Th1) com o aumento das lesões teciduais, já que a produção exacerbada TNF e IFN- $\gamma$  pode destruir células sadias e promover o aumento das lesões (BRELAZ DE CASTRO, 2012; SOUZA *et al.*, 2013; SCOTT, 2016).

Por outro lado, as células que apresentam o perfil Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, e estão associadas com a resistência da infecção e aumento da carga parasitária nas lesões. Apesar da importância da resposta Th1 na cura da infecção, vale ressaltar que as mesmas citocinas envolvidas no controle da infecção podem estar relacionadas com a patogênese da doença. Parece ser necessário a existência de um contrabalanço com as células produtoras de citocinas do tipo Th2, ou seja, uma dicotomia Th1 x Th2 (AKAGUCHI *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2013; SCOTT, 2016).

Outros subtipos de células T CD4+, como células T reguladoras (Treg) e células Th17, também parecem apresentar papel importante na susceptibilidade e resistência à LTA. As células Treg, que se acumulam no local da lesão, estão relacionadas à regulação das células efetoras locais. Já o subtipo celular, conhecido como Th17, relacionado com a produção de IL-17, a princípio, está envolvido com a patogênese de doenças inflamatórias crônicas ou autoimunes.

Nas doenças parasitárias ainda existem muitas lacunas acerca do papel desempenhado por essas células, mas acredita-se que para leishmaniose esse perfil atue como um mecanismo compensatório, ativado quando a resposta Th1 não é eficiente no combate a esses microrganismos (EIDSMO, 2012; SANTOS; BRODSKYN, 2014; SOUZA 2014).

As células T CD8+ também apresentam um papel importante na resposta imune frente às leishmanioses. Uma vez ativadas, as células T CD8+ se diferenciam em células efetoras e ganham a capacidade de destruir as células-alvo contaminadas por meio de sua atividade citotóxica e citolítica (MALTA, 2013). Além disso, os LT CD8+ apresentam um perfil de citocinas semelhante àqueles expressos pelas células T CD4+ (Th 1 ou Th2). Estes grupos celulares são chamados linfócitos T citolíticos (Tc1 e Tc2) e já foram identificados no modelo murino e em humanos (LIMA, 2010).

Apesar de funcionalmente distintas as células T CD4+ e T CD8+ se diferenciam em condições muito parecidas. Ou seja, as citocinas IL-12 e IFN-gama levam à diferenciação de precursores em células Th1 ou Tc1, enquanto IL-4 induz a geração de células Th2 ou Tc2 (LIMA, 2010; STÄGER, 2012). As células Tc2 são tão citotóxicas quanto às células Tc1 e ambos os grupos celulares agem, principalmente, por mecanismo dependente da perforina e granzima ou pela via Fas, embora o perfil Tc1 seja amplamente associado com protozoários intracelulares (FOWLER *et al.*, 2000; STÄGER, 2012).

As células T CD8+ são amplamente conhecidas por suas características citotóxicas/citolíticas, mas também têm propriedades reguladoras importantes (TRANDEM *et al.*, 2011; CARVALHO, 2012). No ano de 2009, Bourreau e colaboradores descreveram em pacientes infectados com *L. guayanensis*, que apresentavam a forma cutânea da leishmaniose, células T CD8+ que expressavam IL-10. De acordo com Trandem *et al.*, 2011, esse papel regulatório das células T CD8+, é um estado de transição das células antes de se tornarem efetoras. Nesse estado de transição as células T CD8+ são capazes de produzir IL-10 sem prejuízo na produção de moléculas como IFN- $\gamma$  e TNF (SUN *et al.*, 2009; PALMER *et al.*, 2010; ZHANG e BEVAN, 2011; CARVALHO, 2012, FALCÃO, 2015). Apesar de vários autores descreverem esse papel regulatório em modelos murinos e humanos ainda há muito que ser estudado. Existem divergências sobre essa função regulatória e sobre como ela está associada à progressão e cura da leishmaniose (TRANDEM *et al.*, 2011; CARVALHO, 2012).

No entanto, o papel protetor das células T CD8+ durante as infecções por *Leishmania* spp. tem se mostrado bastante controverso. Alguns estudos mostram que a resposta T CD8+ varia de acordo com diversos aspectos da infecção, sobretudo a espécie envolvida e as características clínicas da doença (LIMA, 2010; STÄGER, 2012; GOMES, 2017).

Cardoso e colaboradores (2015) demonstraram em seus estudos que pacientes com a doença ativa, apresentam maiores quantidades de células T CD8+ quando comparados à pacientes que apresentam forma suclínica da doença. Além disso, quando comparadas, as células T CD8+ de pacientes com lesão ativa conseguem produzir níveis superiores de TNF e granzima B. Essas substâncias são

extremamente importantes o controle da infecção, porém em excesso lesionam células saudáveis do hospedeiro, levando ao aumento da lesão tecidual (CARDOSO *et. al.*, 2015).

Dentro da resposta imune frente à *Leishmania* ssp. destacam-se também as células Natural Killer (NK), essa população compreende a aproximadamente 15% de todos os linfócitos circulantes. Devido à sua alta habilidade de produzir citocinas pró inflamatórias e de lisar células alvo sem prévia sensibilização, essas células são cruciais para o desenvolvimento de uma resposta imunológica eficiente (CAMPOS, 2014). No sangue humano a maior parte das NK são caracterizadas por apresentarem marcadores de superfície de membrana CD3<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup>, a minoria são conhecidos por expressarem tanto CD3 quanto CD56, e por serem capazes de realizar citotoxicidade não restrita ao MHC-I (BRITTO, 2015; GOMES, 2017)

Baseando-se na densidade de expressão de CD56 na superfície celular duas sub-populações de células NK foram identificadas em humanos. A maioria delas, cerca de 90%, possuem baixa densidade de expressão de CD56<sup>dim</sup> e alta expressão do receptor CD16, essa subpopulação representa a classe de NK mais citotóxica (BRITTO, 2015). Enquanto que 10% das células NK apresentam uma alta densidade de expressão de CD56<sup>bright</sup> e uma baixa expressão de CD16 ou uma alta densidade de expressão de CD56 e não expressam CD16 e possuem maior habilidade para produção de citocinas e menor capacidade citotóxica e citolítica. Conhecidamente as NK CD56<sup>bright</sup> se proliferam e produzem IFN em resposta a estimulação de IL-12 (CAMPOS, 2014; FALCÃO *et. al.*, 2015).

Além das duas populações descritas, existe uma terceira população de células NK, marcada pela presença do marcador CD16 e ausência de CD56. Embora raras essas células já foram descritas em indivíduos com doenças crônicas de origem viral e outros parasitas intracelulares. Outra característica das NK's é que assim como os linfócitos T citotóxicos que apresentam em sua superfície moléculas CD3 e CD8, cerca de 30-40% das células NK são conhecidas por expressarem a molécula CD8<sup>+</sup> porém, a densidade de expressão deste marcador é menor nas células NK do que nas células T CD8<sup>+</sup> (BRITTO, 2015; SANTOS-MATEUS 2016).

As células NK desempenham um papel central na resposta imune contra

infecções, sobretudo nas infecções intracelulares. Essas células possuem a capacidade de lisar diretamente a célula alvo através da produção e secreção de IFN e TNF e interação com células dendríticas. Além de ativar macrófagos e os induzirem a produzir óxido nítrico e citocinas que estimulam uma resposta do tipo Th1, gerando uma resposta imune adaptativa satisfatória (MALTA, 2013).

Menos de 1% da população de linfócitos T no sangue periférico humano expressam tanto marcadores de células NK quanto marcadores de células T e são conhecidas como células T NK (NKT) (Ohteki and MacDonald 1994; Emoto, MITTRUCKER et al. 1999). O TCR dessas células não interage com MHC, reconhecendo antígenos glicolipídicos associados com CD1d, que é uma molécula não clássica na apresentação de antígenos. Essa sub-população timo-dependente aparece tardiamente em relação aos outros subgrupos citados acima (GODFREY, 2007). Até o momento dois tipos de células NKT foram identificadas: células NKT do tipo I ou células NKT invariantes (iNKT), e células do tipo II ou NKT não-invariantes, em relação à expressão de seu TCR, e podem se apresentar como: duplo negativas CD4-CD8-, CD4+ e ainda CD8+. Por possuírem características de células NK e linfócitos T, as células NKT possuem a capacidade de atuar de maneira diferenciada, como células efectoras e reguladoras, produzindo altos níveis de IFN- $\gamma$  ou IL-4 para promover a ativação de uma resposta do tipo Th1 ou Th2, além de interagem diretamente com células dendríticas (SAVAGE et al. 2007; SANTOS et. al., 2013; CARDOSO, 2015).

Vale a pena ressaltar que as células T CD8 +, células NK e NKT utilizam dois mecanismos para destruir as suas células-alvo. No primeiro, e principal mecanismo, a morte celular é induzida por meio da liberação de grânulos citotóxicos no citoplasma da célula alvo que induz a morte celular programada, através de fragmentação do DNA (RUIZ AND BECKER 2007; SANTOS et. al., 2013; CARDOSO, 2015). O segundo mecanismo envolve a ligação de receptores à ligantes presentes nas células alvo, tais como FAS e FAS ligante, o que resulta na apoptose dependente de caspase (MALTA, 2013).

Nos seres humanos, células secretoras de grânulos líticos como granzimas e perforinas são recobertas por uma glicoproteína de membrana lisossomal (LAMP-1), também conhecido como CD107a. Quando ocorre a degranulação dos linfócitos

citotóxicos, CD107a é expressa na superfície da célula sendo assim um marcador importante para a evidenciar a presença de células citotóxicas no processo inflamatório (KEEFE et al. 2011; NOVAIS et. al., 2015).

Muitos estudos sugerem que a citotoxicidade é um dos principais mecanismos patológicos induzido pela infecção de *Leishmania* spp. essa citotoxicidade pode impulsionar a imunopatologia na LC. A expressão de CD107 em pacientes com as formas mais agressivas da doença reforça a participação dessa citotoxicidade na patogênese da leishmaniose (FARIA et. al., 2009; DANTAS et. al., 2013; SANTOS et. al., 2013; CARDOSO, 2015; ATTARHA et. al., 2015 NOVAIS et. al., 2015)

A diversidade de mecanismos imunológicos relacionadas à LTA evidenciam a sua complexidade. Identificar que perfis celulares estão envolvidos em cada etapa da infecção e compreender a resposta imune protetora e patológica na infecção por *Leishmania* spp é crucial para o desenvolvimento de novas estratégias em relação a tratamento e medidas profiláticas (BOTTREL et al., 2001, BRELAZ et al., 2012; DUTHIE et al., 2012).

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 TIPO DE ESTUDO**

O estudo é do tipo experimental. Este ensaio consiste na comparação entre um grupo de participantes sujeitos à intervenção e outro formado por sujeitos não-expostos à intervenção, denominado controle. Ambos escolhidos a partir de critérios de disponibilidade ou conveniência (ROUQUAYROL; ALMEIDA FILHO, 2003).

#### **4.1.1 População de estudo**

Os pacientes do presente estudo foram procedentes de área endêmica para LTA em Pernambuco (Moreno, Jaboatão e Vitória de Santo Antão). Foram selecionados 37 pacientes que possuíam a forma cutânea da doença. Todos tiveram o diagnóstico confirmado por critérios clínicos, epidemiológicos e ao menos dois testes laboratoriais considerados positivos (PCR, Citometria de Fluxo, IDRM e IFI). Foram pacientes de ambos os sexos, com idade superior a 10 anos, portadores de lesões ativas, sem doenças cutâneas concomitantes.

O tratamento quimioterápico foi realizado nos postos de saúde dos municípios deste estudo, utilizando-se o Glucantime® (antimoniato de N-metilglucamina) administrado por via intramuscular. Os pacientes foram submetidos à nova série do tratamento de acordo com o processo de cicatrização de cada indivíduo.

O grupo controle foi constituído por 10 indivíduos considerados saudáveis, residentes de área não endêmica, não-receptores de transfusão sangüínea e sem história prévia da doença. De cada indivíduo foram coletados 18 ml de sangue, o material coletado foi processado no laboratório de Imunogenética do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ-PE), na cidade de Recife-PE.

#### 4.1.2 Exames laboratoriais de avaliação dos pacientes

Além da avaliação clínica e epidemiológica, os pacientes foram submetidos a alguns procedimentos laboratoriais para confirmação da doença em colaboração com o Serviço de Referência em Leishmanioses do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (CPqAM-FIOCRUZ). Os exames incluíram: Intradermoreação de Montenegro (IDRM) reação de imunofluorescência indireta (IFI); citometria de fluxo, pesquisa direta de aspirado de lesões e reação em cadeia da polimerase (PCR).

#### 4.1.3 Considerações éticas

Prosseguimos com os procedimentos para coleta de sangue somente após o paciente ter concordado em assinar o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (TCLE) (Apêndice A e B). O mesmo processo foi seguido para o grupo controle (n=10), para qual as amostras só foram coletadas mediante assinatura do TCLE (Apêndice C).

Os protocolos experimentais foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética do CPqAM/FIOCRUZ, parecer CAEE nº 11083812.7.0000.5190 (Anexo A).

## 4.2 OBTENÇÃO DO ANTÍGENO TOTAL DE *L. BRAZILIENSIS*

A cultura foi expandida em meio de cultura Schneider's (Sigma, St. Louis, MO) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF; Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 1% de antibiótico (100UI/ml de penicilina e 100µg/ml de estreptomicina; Sigma, St. Louis, MO) na cultura de *L. braziliensis* em garrafas médias para obter aproximadamente  $10^{-6}$  parasitas. A cultura foi centrifugada em tubos cônicos (400 x g por 10 minutos) e depois lavada com PBS por três vezes. Posteriormente o pellet celular foi ressuspenso em 750 µl de tampão e 250 µl de inibidor de protease.

A suspensão foi colocada em tubos eppendorf. Congelada e descongelada em nitrogênio líquido e banho-maria até as células estarem completamente lisadas. A suspensão foi centrifugada a 4°C, 10.000 x g por 15 min. O sobrenadante foi coletado e o pellet celular guardado. Quantificada as proteínas por Bradford, a suspensão foi levada para espectrofotometria. Feita a leitura, a suspensão foi aliqüotada e congelada a -80 °C até o momento do uso.

#### 4.3 OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC)

Dezoito mililitros (18ml) de sangue foram coletados utilizando-se o sistema a vácuo. As amostras sanguíneas foram coletadas em tubos na presença de heparina e utilizadas para obtenção do PBMC. O sangue foi diluído em PBS na proporção 2:1 e transferido delicadamente para tubos cônicos contendo Ficoll-Hypaque (Amersham Bioscience, Uppsala, Suécia), também na proporção 2:1. As amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 400 x g. Realizamos a coleta da camada de PBMC, que foi transferida para um tubo cônico de 50 ml. As PBMC's foram lavadas duas vezes com 20ml de PBS e submetidas a nova centrifugação, a 300 x g por 15 minutos a 20°C. Depois do descarte do sobrenadante, o sedimento foi ressuspendido em meio de cultura RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de SFB (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 1% de antibiótico (100UI/ml de penicilina e 100µg/ml de estreptomicina; Sigma, St. Louis, MO). Uma alíquota da suspensão celular foi então removida, diluída em azul de trypan (Sigma, St. Louis, MO) e quantificada em câmara de Neubauer, sendo feito o ajuste celular para o ensaio. Parte das células ajustadas foi levada para o congelamento em meio RPMI (80%), soro fetal bovino (10%) e 10% DMSO.

#### 4.4 CULTURA CELULAR

As PBMCs foram cultivadas em tubos de polipropileno de 12 ml para cultura celular (Falcon™ Round- Bottom). O cultivo foi realizado em meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, Cultilab, Campinas, SP, Brasil) contendo 1% de L-

glutamina 200 mM, 1% piruvato de sódio 100 mM, 0,2% de bicarbonato de sódio 7,5% e 1% de antibiótico (penicilina 100 UI/ml e estreptomicina 100 mg/ml; Sigma, St. Louis, MO) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, SP, Brasil). As PBMCs foram cultivadas sobre 3 condições, sendo um dos tubos o controle negativo contendo apenas as células e meio RPMI, no segundo tubo as células foram estimuladas com antígeno total de *Leishmania* (10 µg/ml) e para controle positivo do ensaio, foi utilizado o mitógeno fitohemaglutinina (PHA) (Cultilab) na concentração de 2,5µg/ml, no tubo 3. Os tubos foram mantidos em estufa à 37°C/5% de CO<sub>2</sub> durante 72 horas.

#### 4.5 MARCAÇÃO EX VIVO DE LINFÓCITOS

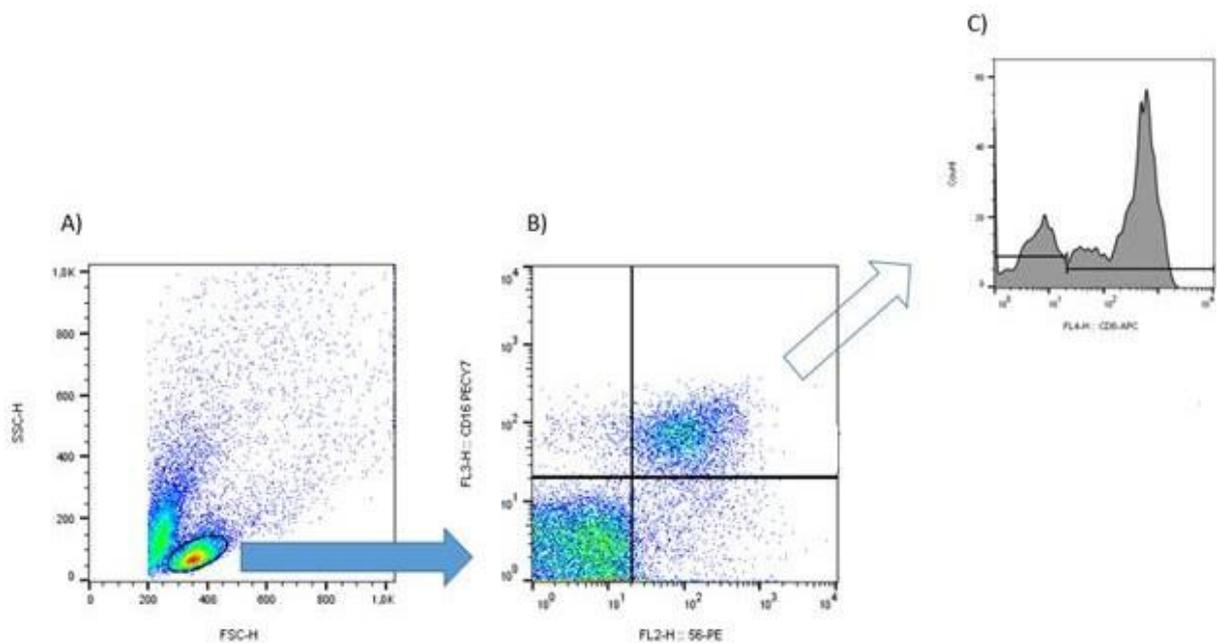
Para determinação das populações de células T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup>, Linfócito B, NK e NKT, PBMCs (5 x 10<sup>5</sup> células/ml) foram suspensas em Tampão Fosfato- Salino (PBS) e marcadas com os anticorpos de superfície anti- CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD45RO, CD56, CD107 por 20 minutos em Temperatura Ambiente (TA) ao abrigo da luz. Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes com 1 ml de PBS, seguida por centrifugação (300 x g por 10 minutos, TA). As amostras foram então ressuspensas em 200µL de PBS e analisadas (>20 mil eventos/tubo) em citômetro de fluxo (FACSCalibur- BD Bioscience) usando o software “Cell Quest Pro” (BD Bioscience) para aquisição dos dados e para análise o software FlowJo 7.6.5 (®Tree Star Inc.).

#### 4.6 ESTRATÉGIA DE ANÁLISE NA CITOMETRIA DE FLUXO

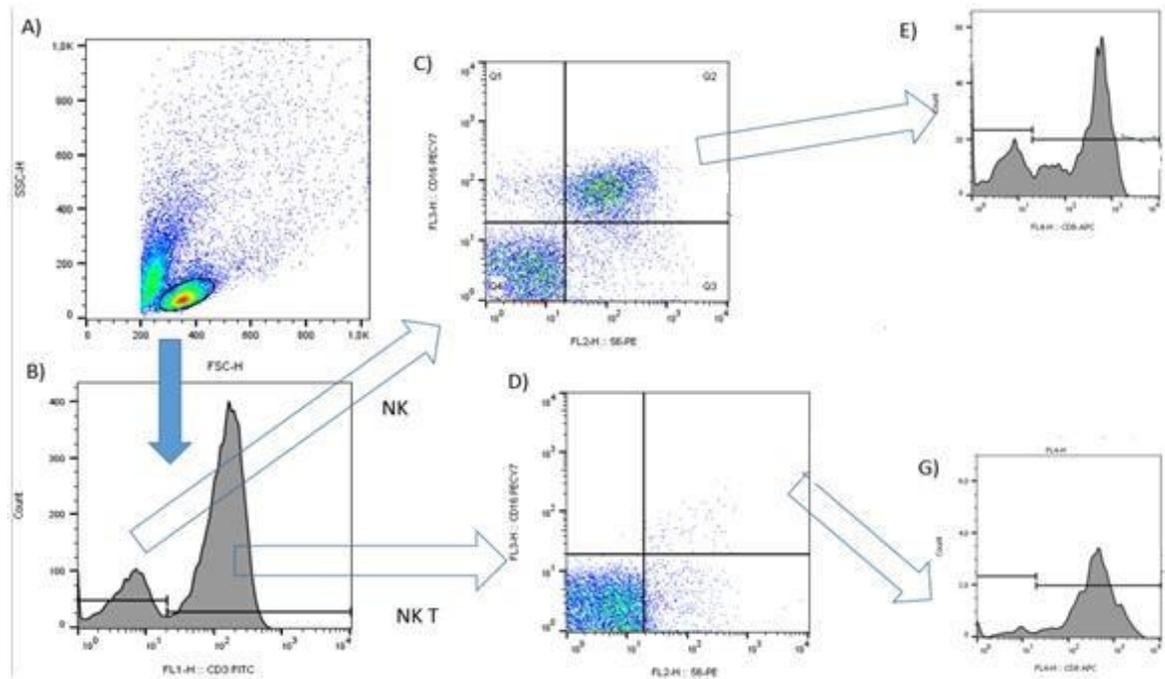
As análises foram realizadas inicialmente delimitando-se a região linfocitária no gráfico de Dispersão Frontal (FSC) versus Dispersão lateral (SSC) (Figura 9- 12A). A partir dessa região os gráficos de fluorescência e respectivos histogramas foram construídos, delimitando-se os quadrantes/regiões de análise de acordo com a população de interesse a ser caracterizada. Os limites dos quadrantes foram

sempre baseados na população negativa, nas titulações dos anticorpos, associados ao FMO (Fluorescence Minus One), quando necessário. Os valores considerados para análise da fluorescência foram os do percentual da região linfocitária para cada quadrante e/ ou histograma. Para análise das células NKs, delimitada a região linfocitária, seguiu-se a identificação das células duplo positivas para os antígenos CD56 e CD16 (Figura 9B) e, dessas, foi verificado o percentual das que expressavam CD8 (Figura 9C). Para análise com separação das células NKs das NKTs, inicialmente os linfócitos T CD3<sup>+</sup> foram identificados através de histograma (Figura 10 B). A partir das populações positivas e negativas foram identificadas aquelas que expressavam CD56 e CD16 (Figura 10 C e D). As células NKT (CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) e NKs (CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>) foram então avaliadas quanto a expressão de CD8 (Figura 10 E e G). A delimitação da região linfocitária também serviu para identificação posterior dos linfócitos B CD19<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> através de histogramas (Figura 11 A, B, C, D, respectivamente). Por fim, para análise dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> que expressavam o marcador de ativação CD45RO, foi feita a delimitação da região linfocitária (Figura 12 A), seguida dos gráficos dot plot (Figura 12 B e C).

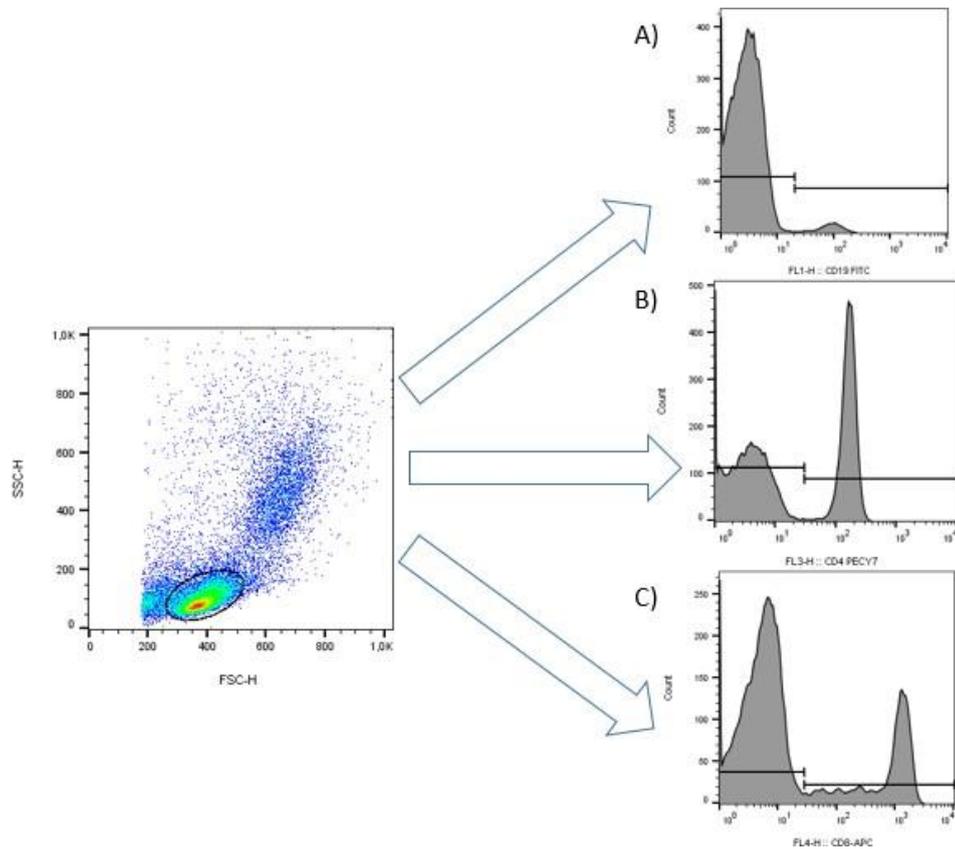
**Figura 9-** Estratégia de análise para identificação de células NK. A) região linfocitária; B) Dot plot para CD56 x CD16; C) Histograma para CD8



**Figura 10-** Estratégia de análise para identificação de células NK e NK T. A) região linfocitária; B) Histograma para CD3; C) e D) Dot plot para CD56 x CD16; E e G) Histograma para CD8.

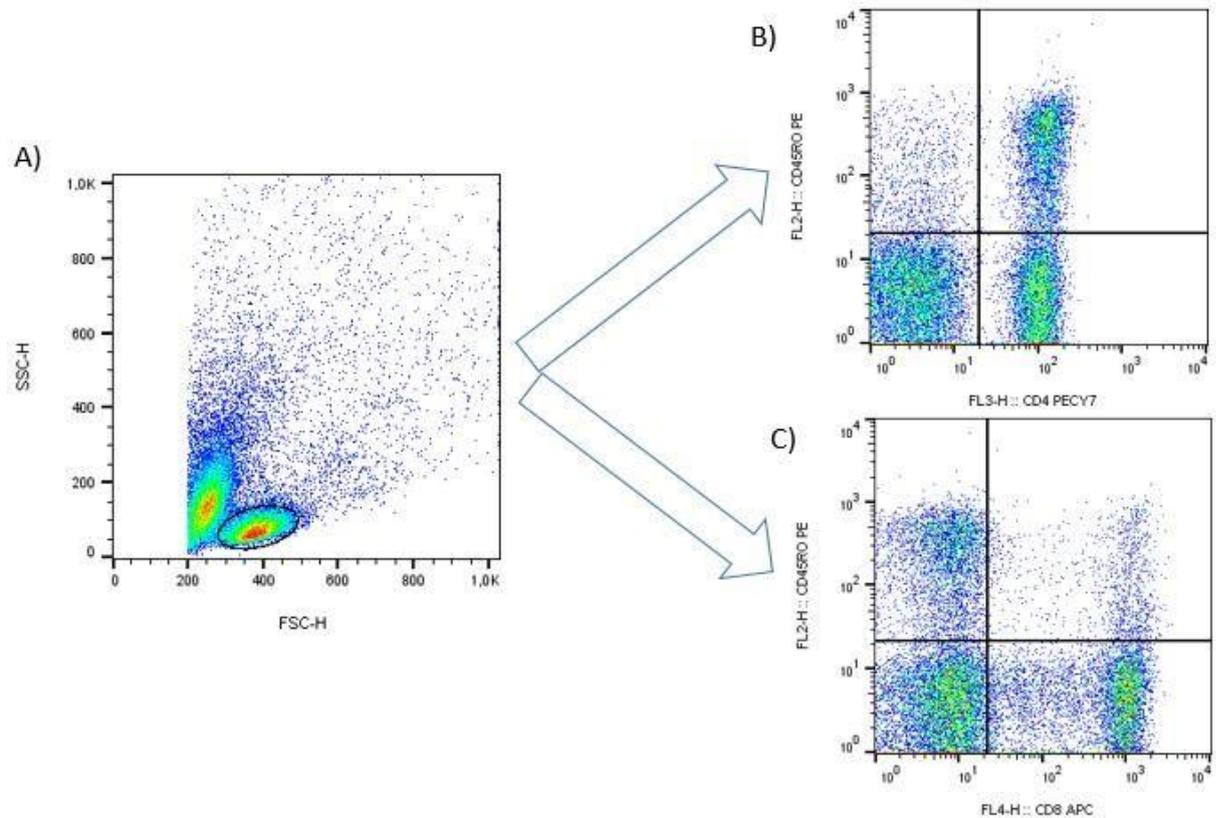


**Figura 11-** Estratégia de análise para identificação de linfócitos B CD19<sup>+</sup> (A) e



linfócitos T CD4 (B)<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> (C)

**Figura 12** - Estratégia de análise para identificação de linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> (B) e CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>(C). A letra A representa a região linfocitária



#### 4.7 ANTICORPOS MONOCLONAIS UTILIZADOS NAS MARCAÇÕES POR CITOMETRIA DE FLUXO

Os anticorpos utilizados nesse estudo foram adquiridos das empresas BD Pharmigen (San Jose, CA), Ebioscience (San Diego, CA), Immunotools (Friesoythe, Germany) e estão listados na tabela 1

**Tabela 1- Lista de anticorpos monoclonais utilizados nos ensaios de citometria de fluxo.**

<b>Anticorpo</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Clone</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Identificação celular</b>
CD45RO	FITC	HI100	BD	Marcador de ativação da célula
CD3	FITC	HIT3a	BD	NKt
CD19	FITC	HIB19	Ebioscience	Linfócito B
CD8	APC	UCHT-4	Immuno Tools	Linfócito T CD8
CD4	PE-Cy7	SK3	BD	Linfócito T CD4
CD16	PE-Cy7	3G8	BD	NK
CD56	PE	B-A19	Immuno Tools	NK

#### 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para expor os resultados obtidos, realizou-se uma análise descritiva. A apresentação das variáveis mensuradas foi feita através de tabelas ou gráficos incluindo também o uso de algumas medidas descritivas.

Para testar a suposição de normalidade e homogeneidade das variáveis envolvidas no estudo foram aplicados os testes de Shapiro-Wilk e Bartlett respectivamente. As diferenças de médias/medianas foram avaliadas utilizando os testes T-Student e Anova quando observado os pressupostos de normalidade ou

homogeneidade. Quando não, utilizaram-se os testes não paramétricos Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis.

Para as análises das variáveis que tiveram uma abordagem com os testes Anova ou Kruskal- Wallis, aplicaram-se os seus devidos testes de post hoc observando os pressupostos estatísticos para a utilização dos mesmos. Para as variáveis que tiveram uma avaliação inicialmente no basal e após estímulo com o antígeno de *Leishmania* foram avaliados utilizando teste pareado em concordância com o pressuposto observado. Desta forma, foram avaliadas as medias ou medianas das variáveis envolvidas no estudo.

As demais conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%, e o software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2012) e GraphPad Prism 5 foram utilizados na obtenção dos resultados.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA

Os pacientes participantes da pesquisa (n= 37) foram classificados como antes do tratamento (AT) respeitando os critérios de inclusão e exclusão. Dentro do grupo estudado (37), houve uma predominância de indivíduos do sexo masculino, 24 indivíduos (78,4% dos pacientes). Destes, 24 pacientes (68,8%) executavam atividades laborais que permitiam o contato direto com áreas florestais e/ou rurais. O tempo médio de evolução da doença antes do diagnóstico foi de 2,5 meses, variando de 1 a 24 meses, entretanto 27 pacientes (73%) tiveram tempo de evolução da doença inferior à média. Em relação à faixa etária, a idade dos pacientes variou entre 13 e 71 anos com média de 30 anos.

Clinicamente, os indivíduos apresentaram dispersão heterogênea das lesões, sendo encontradas na maior parte dos casos, 25 (67,6%), na região de membros (inferiores e superiores) e em menor frequência, 12 (32,4%), na região da face e pescoço. Os dados acima foram resumidos na tabela 2.

]

De acordo com aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais, todos os pacientes do estudo tiveram o diagnóstico para LTA confirmado. O diagnóstico clínico-epidemiológico foi feito de acordo com a avaliação dos médicos dermatologistas do Hospital Oswaldo Cruz no Recife. O diagnóstico laboratorial foi feito em parceria com o Serviço de Referência em Leishmaniose do CPqAM/FIOCRUZ. Todos os pacientes apresentaram resultados positivos em pelo menos dois dos exames laboratoriais realizados, além do diagnóstico clínico confirmado.

Em relação aos exames laboratoriais para confirmação da doença, 22 (59,5%) dos participantes foram submetidos ao teste de IDRM, destes 22 indivíduos 95% apresentaram resposta positiva ao teste, com área de endurecimento acima de 7 mm de diâmetro. A PCR foi realizada em, 37 pacientes (100%) e mostrou-se positiva em 34 (92%) deles. Dezesete pacientes (45,9%) foram submetidos à pesquisa direta de material aspirado das lesões, sendo que para apenas um deles houve resposta positiva no diagnóstico, quando utilizada essa técnica e apenas 3 dos pacientes

(8,1%) foram submetidos à Imunofluorescência indireta.

**Tabela 2-** Comparação entre os dados clínicos dos pacientes com lesões cutâneas típicas antes do tratamento quimioterápico (AT).

Sexo	Masculino	78,4%
	Feminino	21,6%
Idade (anos)	Média	30 anos
	Desvio Padrão	6 anos
	Mínima	13 anos
	Máxima	71 anos
	≤25	24
	26 – 44	8
	≥45	5
	Período de evolução até o diagnóstico (meses)	Média
Mínimo		18 dias
Máximo		24 meses
≤ 2 meses		73%
≥ 2 meses		27%
Lesões em MMSS, MMII e outras localizações	Membros superiores	54,05%
	Membros Inferiores	40,54%
	Face e pescoço e outras Localizações	5,41%
Tamanho da Lesão	≥ 2 cm <sup>2</sup>	35,6%
	>2cm <sup>2</sup>	12,1%
	Sem dados	52,3%

Legenda: Membros Superiores (MMSS); Membros Inferiores (MMII)

**Tabela 3-** Resultado dos testes laboratoriais do grupo de pacientes estudados.

Paciente	Pesquisa Direta	Isolado de Punção Aspirativa	IDRM	PCR
1	-	-	+	+
2	NR	-	+	+
3	NR	-	+	+
4	NR	-	+	+
5	+	-	NR	+
6	-	-	+	+
7	+	-	NR	+
8	+	-	NR	+
9	NR	NR	+	+
10	--	-	+	+
11	NR	-	+	+
12	+	-	NR	+
13	NR	-	+	+
14	-	-	+	+
15	-	+	NR	+
16	+	S	+	+
17	NR	NR	+	+
18	NR	NR	+	+
19	-	NR	+	+
20	NR	NR	+	+
21	NR	NR	+	+
22	-	NR	+	+
23	-	NR	+	+
24	-	NR	+	+
25	+	NR	+	+
26	NR	NR	+	+
27	+	NR	+	+

**Tabela 3-** Resultado dos testes laboratoriais do grupo de pacientes estudados. Continuação.

28	-	+	+	-
29	NR	NR	+	+
30	+	NR	+	+
31	NR	NR	+	+
32	NR	NR	+	+
33	+	NR	-	+
34	+	-	NR	+
35	NR	+	NR	+
36	-	+	NR	+
37	+	-	NR	+

Legenda: Não Realizado (NR); Positivo (+); Negativo (-); Sim (S)

## 5.2 ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE

### 5.2.1 Percentagem de Células Mononucleares do sangue Periférico, após período de cultura celular com e sem estimulação com antígeno total de *Leishmania braziliensis* .

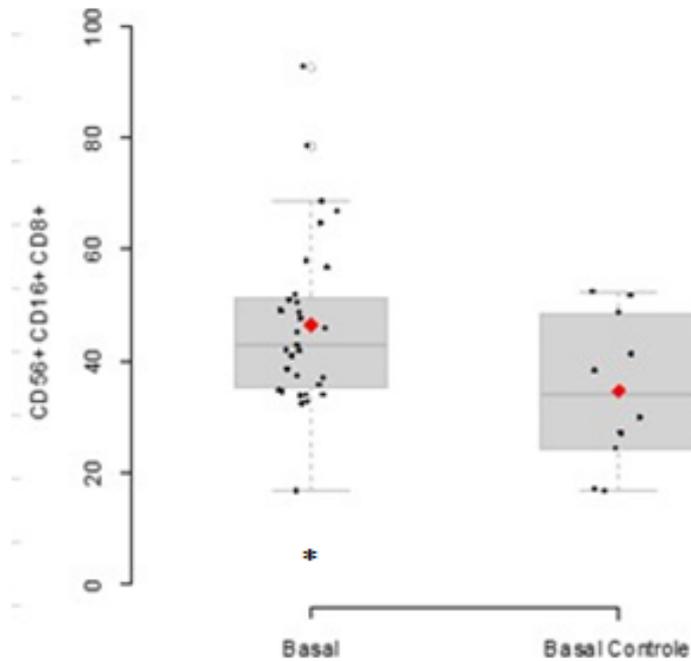
Em humanos, tem se demonstrado que as subpopulações de células do sistema imunológico são heterogêneas, não apenas do ponto de vista fenotípico, mas também funcional. Essas células contribuem de forma diferente no que diz respeito a secreção de proteínas e desenvolvimento ou cura da doença (Brelaz de Castro, 2012; Ferraz, 2017).

No presente trabalho foi realizada uma análise fenotípica das células mononucleares do sangue periférico de pacientes com Leishmaniose Tegumentar antes do tratamento. Após a cultura, alguns subgrupos celulares como NK, NKT e células CD8+/CD 45RO+ apresentaram percentual superior quando comparadas ao grupo controle.

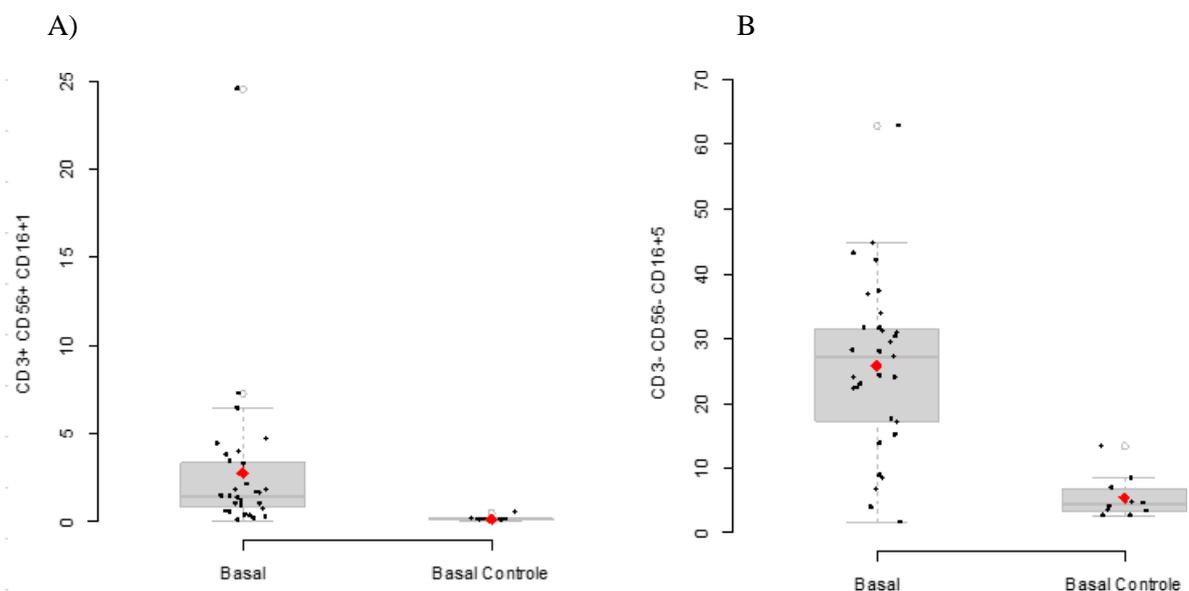
A figura 13 demonstra o percentual de células NK com potencial citotóxico, evidenciado pela avaliação da presença do marcador de superfície celular CD8. Na figura podemos perceber que a frequência de células citotóxicas apresentou-se significativamente aumentado no grupo de pacientes AT quando comparados ao grupo controle.

A figura 14 demonstra a comparação entre a frequência de células NKT (A) e NK (B) sem a presença de estímulo com Antígeno de *Leishmania braziliensis*. Na figura é possível perceber que quando comparado ao grupo controle os níveis de células NK e NKT, encontrados no sangue periférico dos pacientes antes do tratamento, foram significativamente superiores.

**Figura 13:** Comparação de frequência de células CD56+/CD16+/CD8+ em culturas de pacientes AT e grupo controle. Sem a presença de estímulo com Antígeno de *Leishmania braziliensis* ( $p \leq 0,05$ ).



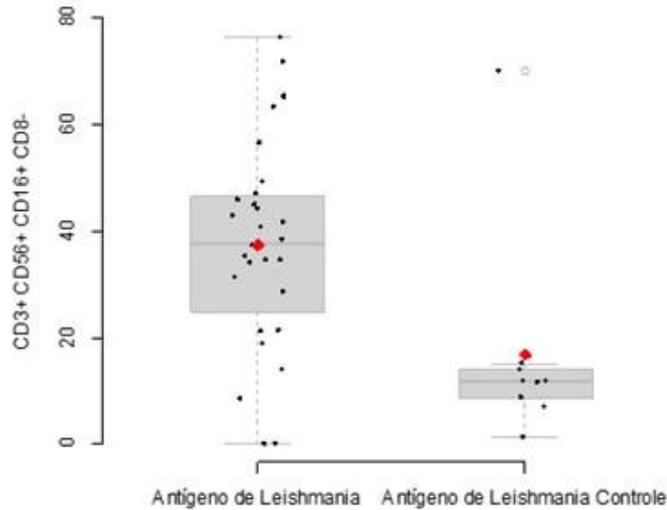
**Figura 14:** Comparação de frequência de células NKT (A) e NK (B) em culturas de pacientes AT e grupo controle. Sem a presença de estímulo com Antígeno de *Leishmania braziliensis* ( $p \leq 0,05$ ).



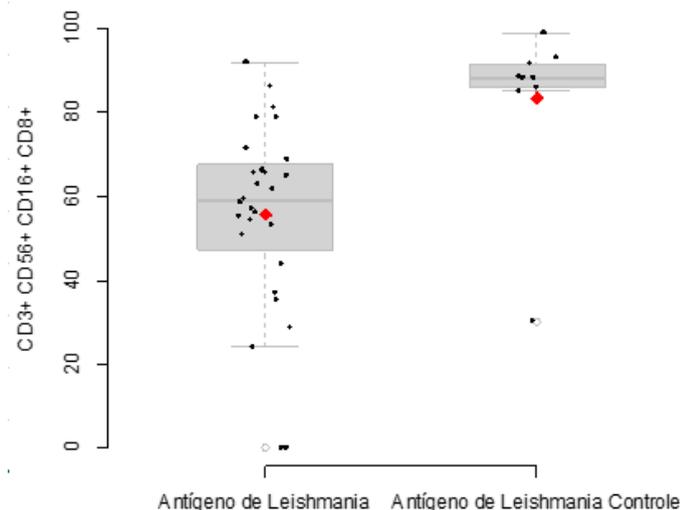


**Figura 16.** Em (A) comparação de frequência de células NKT/CD8-, e em (B) comparação de frequência de células NKT/ CD8+, em cultura de células submetidas a presença do estímulo com antígeno total de *Leishmania braziliensis*.

A)



B)

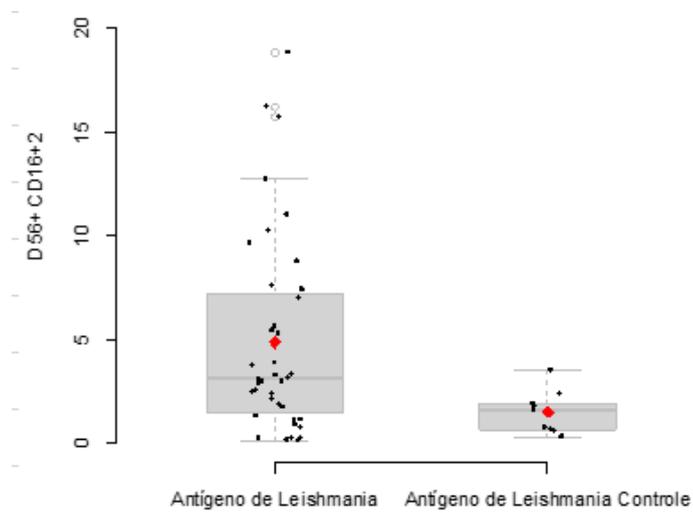


O aparecimento de células com potencial citotóxico foi demonstrado também na figura 17, a partir da avaliação da presença do marcador de superfície celular CD8. Quando comparados, os grupos AT e controle demonstram diferença significativa na frequência de células CD56+/CD16+ e na frequência de células CD56+/CD16+/CD8+. Apresentando maior frequência de aparecimento no sangue periférico de pacientes

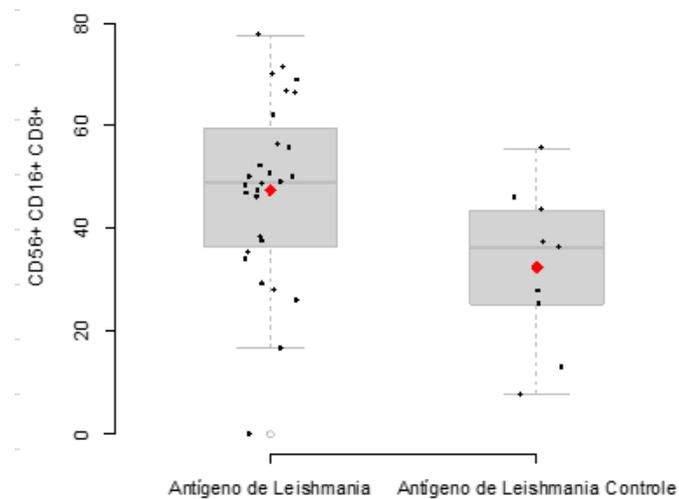
com doença ativa que no sangue periférico do indivíduos do grupo controle.

**Figura 17.** Em (A) comparação de frequência de células CD56+/CD16+, e em (B) comparação de frequência de células CD56+/CD16+/CD8+, em cultura de células submetidas a presença do estímulo com antígeno solúvel de *Leishmania braziliensis* ( $p \leq 0,05$ ).

A)

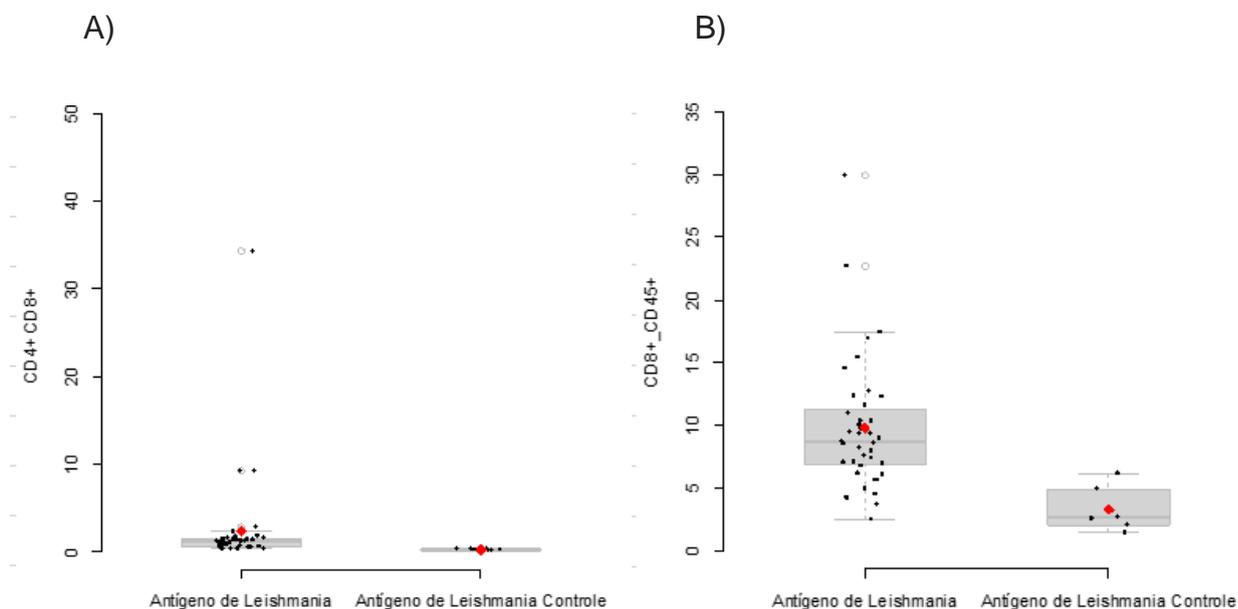


B)



Em nossos estudos também avaliamos a presença de Células T CD4 e T CD8, e o perfil de ativação dessas células por meio do marcador de superfície celular CD45RO. Após a avaliação estatística podemos notar diferenças significativas na frequência de aparecimento dessas células quando comparado ao grupo controle. A Figura 18 representa a comparação entre esse perfil celular em pacientes AT e grupo controle.

**Figura 18.** Em (A) comparação de frequência de células CD4+/CD8+, e em (B) comparação de frequência de células CD8+/CD45RO+, em cultura de células submetidas a presença do estímulo com antígeno solúvel de *Leishmania* spp ( $p \leq 0,05$ ).



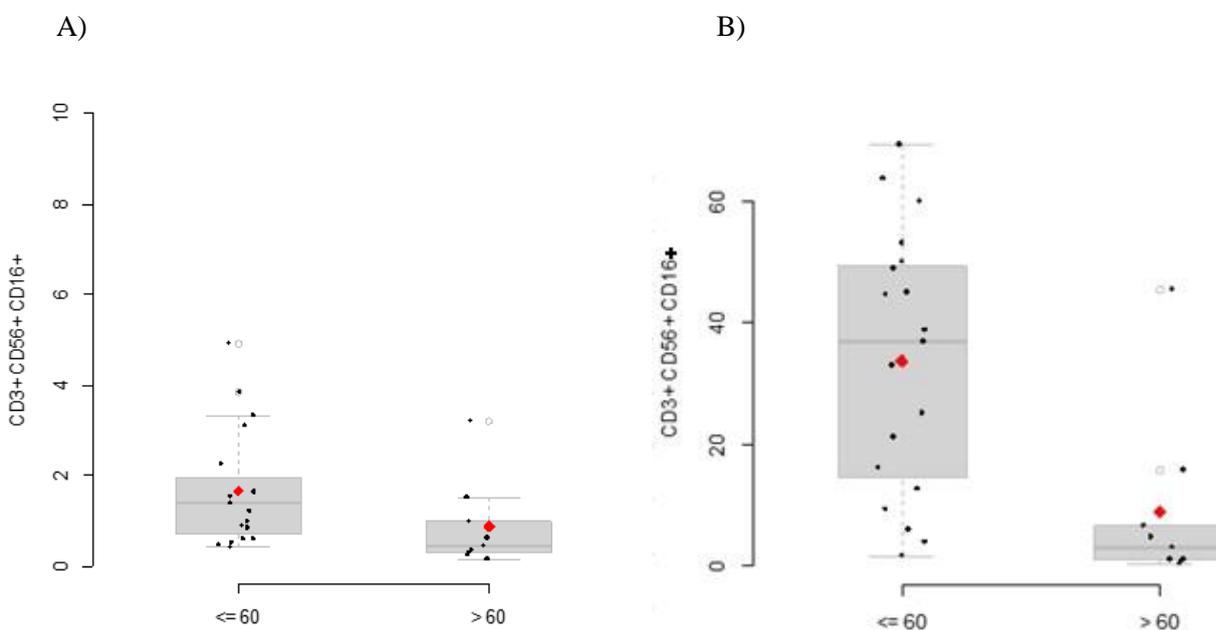
### 5.2.2 Percentagem de Células Mononucleares do sangue Periférico, de pacientes com periodo de evolução da doença menor e maior de 60 dias após periodo de cultura celular.

Com o intuito de avaliar os perfis celulares relacionados com a progressão da LTA, o presente estudo também quantificou a porcentagem de células NK, NKT, T CD8+ e T CD4+ no sangue periférico dos pacientes durante o período de evolução da doença,  $\leq$  à 60 dias e  $>$  maior e menor que 60 dias. Sendo representados graficamente abaixo os resultados significantes.

Com o intuito de avaliar os perfis celulares relacionados com a progressão da LTA, o presente estudo também quantificou a porcentagem de células NK, NKT, T CD8+ e T CD4+ no sangue periférico dos pacientes durante o período de evolução da doença,  $\leq$  à 60 dias e  $>$  maior e menor que 60 dias. Sendo representados graficamente abaixo os resultados significantes.

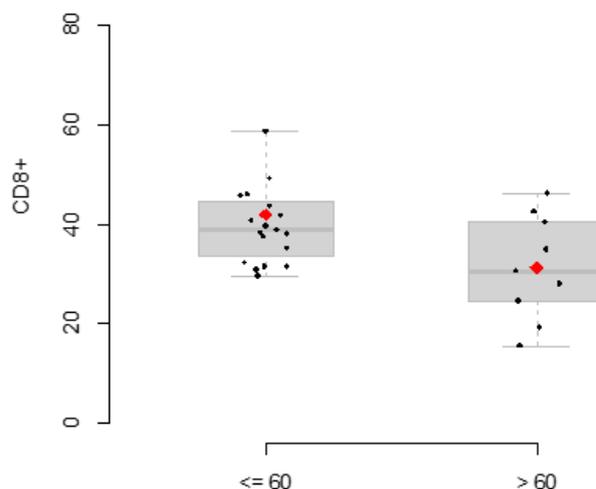
A figura 19 representa a porcentagem de células NKT circulantes no sangue periférico de pacientes com LTA, após período de 72 hs de cultura celular com e sem estímulo de antígeno total de *Leishmania braziliensis*.

**Figura 19.** Comparação entre a porcentagem de células NKT, no sangue periférico de pacientes com LTA, com tempo de evolução da doença menor e maior de que 60 dias. Em (A) cultura células cultivadas sem estímulo de antígeno total de *Leishmania braziliensis* e em (B) células submetidas à estímulo com antígeno total de *Leishmania braziliensis* ( $p \leq 0,05$ ).



Na avaliação das células submetidas ao estímulo com antígeno de *Leishmania braziliensis*, pudemos avaliar um número expressivo de linfócitos citotóxicos (T CD8+), no período inferior à 60 dias da evolução da doença. Esses resultados estão expresso na figura 20.

**Figura 20.** Porcentagem de células T CD8+, presentes em cultura celular de pacientes com LTA após o estímulo com antígeno total de *Leishmania brasiliensis* ( $p \leq 0,05$ ).



### 5.2.3 Percentagem de Células Mononucleares do sangue Periférico, de pacientes com diferentes números de lesão.

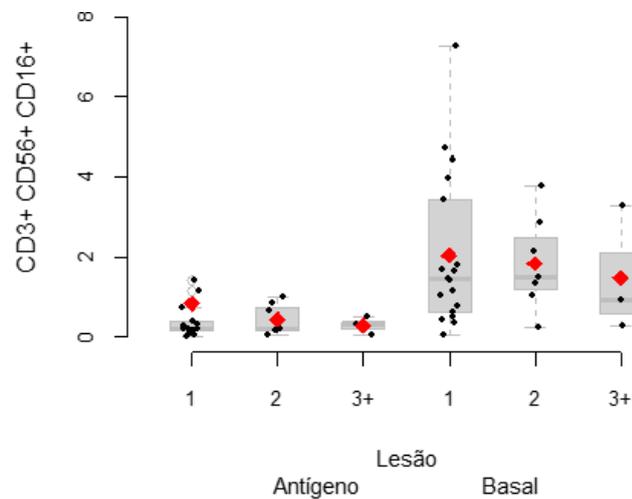
O presente estudo também avaliou a relação entre a quantidade de lesões apresentadas pelos indivíduos e os níveis percentuais de células NK, NKT, T CD4+ e T CD8+ presentes nas culturas de PBMC, com e sem estímulo de antígeno de *Leishmania brasiliensis*. O intuito dessa avaliação foi revelar a possível relação entre o número de lesões e a presença de níveis aumentados dessas populações celulares no sangue periférico de pacientes com LTA.

A figura 21 representa o percentual de células NKT presentes em cultura de PBMC, com e sem estímulo do antígeno, de pacientes com lesões teciduais que variavam de 1 (uma lesão) e 2 (duas lesões) a mais de 3 (três lesões). De acordo com os dados obtidos, houve diferença significativa no percentual de células NKT na cultura células. em estado basal e quando submetidas ao estímulo com antígeno, dos pacientes que apresentaram 3 lesões ou mais..

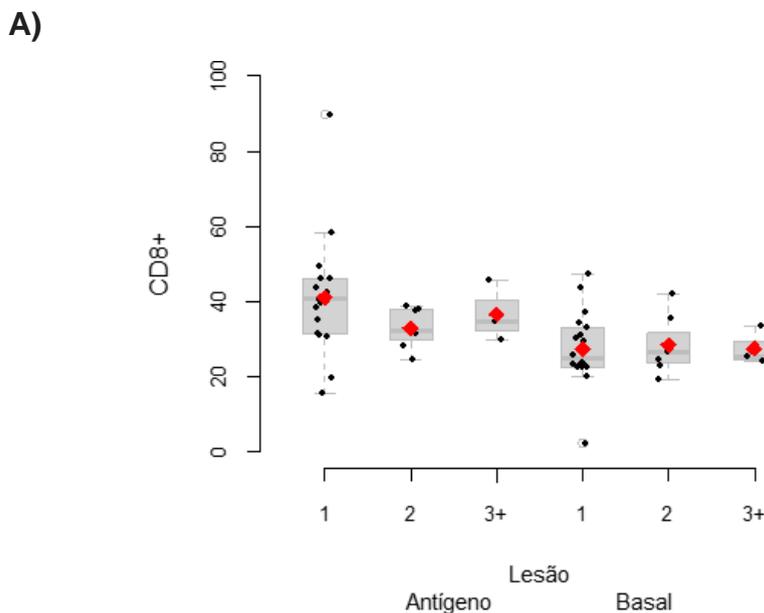
A Figura 22 representa a comparação entre esses perfis celulares em pacientes

AT com diferentes números de lesões teciduais. Em nosso estudo também pudemos constatar a presença aumentada de células citotóxicas (T CD8+). Após a avaliação estatística nota-se diferença significativa na frequência de aparecimento dessas células em pacientes que apresentaram apenas uma lesão, quando comparados aos demais.

**Figura 21.** Porcentagem de células NKT, em cultura de PBMC de pacientes com LTA. Comparação entre grupos de pacientes com diferentes números de lesões teciduais ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 22.** Em (A) porcentagem de células TCD8+, em cultura de PBMC. Comparação entre a grupos de pacientes com diferentes números de lesões teciduais ( $p \leq 0,05$ ).



## 6 DISCUSSÃO

A leishmaniose tegumentar constitui um problema de saúde pública no mundo. Está presente em mais de 85 países e no Brasil, onde já foram notificados casos em todos os estados, é considerada uma doença endêmica (BRASIL, 2017). A principal espécie causadora da doença no país é a *L. (V.) braziliensis*, que após ser transmitida ao ser humano, pela picada do flebotomíneo, infecta macrófagos e células dendríticas, causando lesões na derme e, em casos mais graves, nas mucosas nasal e oral (Carvalho et al, 2012).

Para o tratamento da leishmaniose o Ministério da Saúde preconiza, a mais de cinco décadas, esquemas terapêuticos com antimoniais pentavalentes que, apesar de considerados eficazes, possuem efeitos colaterais acentuados e relatos de resistência cada vez mais frequentes (SVS, 2010; Sundar & Chakravarty, 2013). Dessa maneira, o controle da LT está intrinsecamente ligado ao desenvolvimento novas estratégias de combate à infecção.

Uma vacina capaz de promover uma resposta imunológica eficaz, que controle a infecção e previna o dano tecidual progressivo, seria um modelo ideal. Contudo, para atingirmos progressos no desenvolvimento dessas estratégias de controle, seja na formulação de vacinas ou na melhoria nos fármacos, é necessário um maior entendimento da resposta imunológica associada à cura e à proteção dessa doença.

Em nosso estudo pudemos avaliar parâmetros clínicos e epidemiológicos dos indivíduos envolvidos na pesquisa, além da avaliação de células do sistema imune (NK, NKT, TCD8+, TCD4+, DP) envolvidas em diferentes estágios de evolução da doença. A partir do desenho experimental, e utilizando a citometria de fluxo como ferramenta, identificamos a frequência dessas células citotóxicas presentes na infecção por *Leishmania spp.*

De acordo com nossos resultados a maior parte dos pacientes foi do sexo masculino, com média de 30 anos de idade. Mais de 60% de nossos pacientes praticavam atividade laboral que os permitiam entrar em contato direto com áreas rurais e/ou florestais. Segundo o Ministério da Saúde (2015), a leishmaniose tegumentar ocorre em ambos os sexos e em todas as faixas etárias, entretanto, no

Brasil, predominam os maiores de 10 anos (92,5% do total de casos) e o sexo masculino (74% no ano de 2014). Isso corrobora os nossos achados. A doença atinge principalmente jovens e adultos, em fase produtiva, e tem como característica a íntima ligação com as frentes de trabalho associadas ao desflorestamento, à penetração em áreas de florestas virgens e aos exercícios militares.

O período de incubação da doença no ser humano é, em média, de dois a três meses, podendo variar de duas semanas a dois anos (BRASIL, 2017). No nosso estudo, o tempo médio para o desenvolvimento da doença foi de 2,5 meses. Essa variação de tempo está associada com aspectos como susceptibilidade e estado nutricional do hospedeiro, além da cepa do parasita e quantidade de espécimes inoculados (SANTOS, 2015; FERRAZ, 2017).

Classicamente a LTA apresenta sinais e sintomas característicos mas, que em situações específicas, como a associação de infecções bacterianas no leito da ferida aberta, pode confundir o examinador, levando à um diagnóstico impreciso ou errôneo. Por esse motivo a associação entre dados epidemiológicos, avaliação clínica e exames laboratoriais se faz necessária (AMEEN, 2010; GOTO; LINDOSO, 2010; OLIVEIRA, 2013).

Entre os métodos diagnósticos encontram-se os exames parasitológicos. A pesquisa direta e a punção aspirativa, têm como finalidade evidenciar a presença de formas evolutivas do parasita no interior da lesão, Essa detecção é feita através de preparatos histológicos que podem, em lesões recentes, diagnosticar cerca de 50% das infecções por *Leishmania spp.* Apesar de serem técnicas de baixo custo e de fácil aplicação, apresentam baixa sensibilidade e especificidade, já que a escassez de formas evolutivas do parasita torna difícil a detecção dos mesmos e por conseguinte o diagnóstico preciso (OLIVEIRA et al., 2013, MARTINS, 2014; DANTAS, 2014), como foi visto pela baixa positividade desses exames no nosso estudo.

Frequentemente utilizada no diagnóstico da LTA devido a sua sensibilidade e especificidade, a Intradermorreação de Montenegro (IDRM) é um método que eficaz para o diagnóstico de Leishmaniose. Sua eficácia gira em torno dos 90%, apresentando resposta positiva para a maior parte dos casos de Leishmaniose, inclusive em infecções subclínicas. Contudo pode apresentar resultados falso-

negativo em pacientes que apresentam lesões recentes (NYLEEN; GAUTAM, 2010; SOUZA et al., 2013; BENTES, 2015).

Em nossa pesquisa 27 pacientes foram submetidos à IDRM, destes 26 foram considerados positivos, enquanto apenas 1 paciente obteve resultado negativo ao teste, o que corrobora com a taxa de 90% de eficácia no diagnóstico quando utilizado o método de IDRM. Todos os pacientes participantes da pesquisa foram submetidos à PCR, método de diagnóstico molecular baseado na reação em cadeia da polimerase. Esse método apresenta alta sensibilidade e especificidade e é particularmente útil em amostras que contém poucos parasitos (GOTO; LINDOSO, 2010; DANTAS, 2014). Essa técnica detecta patógenos com eficiência e rapidez. Em nossos estudos, mais de 90% das amostras submetidas ao teste foram positivas, o que auxiliou na determinação do diagnóstico.

A aplicação desse conjunto de técnicas contribuiu para o diagnóstico e classificação desses pacientes. Outro fator importante e também avaliado foi a presença de lesões tegumentares. De acordo com estudos o aparecimento das lesões, bem como a sua cicatrização, está ligada ao desenvolvimento de uma resposta imune protetora efetiva contra esse patógeno intracelular (SANTOS, 2015; FERRAZ, 2017).

Essa resposta requer a ação coordenada de diversos tipos celulares das respostas imunes inata e adaptativa (Brelaz-de-Castro et al, 2012). Vale ressaltar que a maior parte dos estudos realizados e publicados tem como foco o papel das citocinas envolvidas nessa infecção e que pouco ainda é conhecido a respeito da participação de células citotóxicas na LTA (Stäger & Rafati, 2012).

De acordo com Santos e colaboradores (2013), existem moléculas-chaves e tipos de células diferentes responsáveis pelo processo inflamatório da LT. Dentro da diversidade de moléculas, TNF e IFN- $\gamma$  são as principais citocinas inflamatórias, importantes no controle da multiplicação parasitária, durante as fases iniciais da Leishmaniose Tegumentar. Os níveis aumentados dessas citocinas estão relacionados com a cura ou com a gravidade da doença. As células T CD4<sup>+</sup> são as principais fontes de produção de IFN- $\gamma$ . Em nosso estudo não houve frequência maior de células T CD4<sup>+</sup> na cultura celular dos pacientes com LT. Portanto não identificamos

relação entre células T CD4+ e o tamanho das lesões de nossos pacientes. Em contrapartida, avaliando os resultados obtidos, percebemos que nos primeiros 60 dias da infecção por *Leishmania spp*, a frequência de células T CD8+ apresentou-se aumentada. Alguns autores sugerem que o aumento dessas células está envolvido no controle da LTA, modulando a atividade dos linfócitos T CD4+ e atuando de forma direta nos macrófagos através de seu efeito citolítico e citotóxico (BOTELHO et al, 2009; BRELAZ-DE-CASTRO et al., 2012; SANTOS et al., 2013; SANTOS et al., 2014; OLIVEIRA, 2014).

As células T CD8+ fornecem imunidade contra uma grande variedade de patógenos. Essas células geralmente são consideradas como contribuindo para a imunidade e proteção contra *Leishmania spp*. (Santos, 2013).

Em 2002, Machado e colaboradores, observaram uma notável presença de células T CD8+ enquanto estudavam a citotoxicidade *in situ* na LTA. Após a observação, sugeriram que essas células estariam envolvidas na eliminação do parasita e no desenvolvimento das lesões ulcerativas. Estudos mais recentes, que avaliaram o papel de células T CD8+, demonstraram a importância dessa população celular na evolução da doença (Novais, 2013). Confirmando que essas células desempenham tanto papel protetor, quanto indutor da abertura de lesões devido ao seu potencial citotóxico. Esses estudos ainda sugerem que o aumento dos níveis de células T CD8+, no sangue de pacientes durante a infecção, e a produção de IFN- $\gamma$  são importantes para a cura das lesões e também para proteção imunológica. (Novais et. al. 2015; Ferraz et.al. 2017).

Em nosso trabalho, não houve diferença significativa no percentual de células T CD8+, na cultura de PBMC's dos pacientes, independente do número de lesões tegumentares encontradas. Alguns estudos demonstram que o aumento dos níveis de células T CD8+ no sangue de pacientes com LT acontece durante os primeiros momentos da infecção, e que esse número diminui quando essas células são recrutadas para o leito da ferida. (NOVAIS et. al. 2015; FERRAZ et.al. 2017).

As células T CD8+ também são importantes para a modulação da resposta das células T CD4+. Na leishmaniose humana, foram descritos papéis importantes dessas células no processo de cicatrização através da produção de IFN- $\gamma$  e em resistência à infecção (Santos, 2014). No entanto, poucos estudos avaliaram esse papel na

infecção primária. Nosso grupo usou uma abordagem experimental *in vitro*, estimulando PBMC's de pacientes com LTA, por 72hs na presença de antígeno total de *Leishmania braziliensis*. Observamos um aumento significativo de células T CD8+ nos momentos iniciais da infecção (período inferior a 60 dias). Observamos também que as células T CD8+ expressaram de maneira significativa o marcador de ativação celular CD45RO+, quando estimuladas com antígeno de *Leishmania braziliensis*, demonstrando que essas células seriam importantes no desenvolvimento da imunidade adquirida à infecção.

Outra população de linfócitos T com potencial papel citotóxico são as células T duplo-positivas (DP). Essas células vem sido estudadas em infecções virais, cânceres, doenças auto imunes e mais recentemente na Leishmaniose cutânea (Nogueira, 2015).

As células DP já foram encontradas em órgãos periféricos e na pele, poucos estudos mostraram sua presença em sangue periférico. Há alguns anos, pesquisadores sugeriram que estas células seriam timócitos que teriam deixado o timo prematuramente, mas recentemente foi mostrado que as células T DP periféricas perdem a expressão de marcadores tímicos, indicando que mesmo expressando CD4 e CD8 estas células atuam como populações maduras, ainda que em baixa frequência (Overgaard et al., 2015).

O papel destas células na resposta imune contra parasitos ainda é pouco explorado e função na Leishmaniose Tegumentar ainda não foi elucidado. Nosso estudo demonstrou a frequência aumentada dessas células o sangue periférico de pacientes AT. Alguns autores sugerem que a atividade citotóxica dessas células seja realizada através do recrutamento seletivos dessas células até o leito da lesão onde desempenham sua função citotóxica (Nogueira, 2015).

A participação coordenada de células da imunidade inata e adaptativa em ações contra patógenos intracelulares é fundamental para uma resposta imune protetora e eficaz contra LTA. Neste sentido, já se sabe que as células NK e T CD8+ atuam em sincronia produzindo citocinas pró-inflamatórias em resposta à essa invasão (Trapani and Smyth 2002; Faria, Souza et al. 2009; Novais, Carvalho et al. 2013). Enquanto a presença de células T CD8+ na patogênese da LTA têm sido muito estudada (Faria, Souza et al. 2009; Dantas, Oliveira et al. 2013; Novais, Carvalho et al. 2013; Boaventura et al. 2013; Cardoso, et al. 2015), pouco se sabe ainda sobre a participação das células NK e NKT na resposta imune frente à Leishmaniose em

pacientes

Neste trabalho, maiores percentuais de células NK e NKT foram observados no grupo de pacientes com a doença ativa (AT) quando comparado ao grupo controle. Em nossas análises foi possível notar diferenças significativas na frequência de células NKT em períodos inferiores à 60 dias de evolução da doença.

Fenotípicamente células NK e NKT expressam em sua membrana moléculas de adesão CD56 e do receptor CD16 (Lanier, 1986). Essas células estão envolvidas na defesa do hospedeiro frente as mais diversos tipos de doenças, sobretudo às infecções intracelulares, sem a necessidade de sensibilização previa ou reconhecendo uma gama quase infinita de moléculas ( MORETTA, 2007; SPITZ et al, 2016).

Estudos *in vitro* associam a frequência aumentada de células NK e NKT, no sangue periférico de pacientes com LTA, não só a capacidade citotóxica dessas células, mas também à produção de citocinas como IFN- $\gamma$  e TNF, que contribuem para o desenvolvimento de uma resposta Th1 e à ativação de macrófagos (Stetson, Mohrs et al. 2003; Laouar, Sutterwala et al. 2005; Prajeeth, Haeberlein et al. 2011; Bogdan 2012).

As células NK representam uma população de linfócitos que não possuem em sua membrana moléculas CD3 e, em pacientes saudáveis, compreendem a cerca de 15% do total das células mononucleares do sangue periférico (LANIER, 1986; 2005).

Funcionalmente têm sido estudadas por sua capacidade citotóxica e capacidade de modular a resposta imune como acontece, por exemplo, na indução da maturação de Células Dendríticas por meio da produção de TNF (ASKENASE et al, 2015; GOLDSZMID et al, 2012) Outros estudos confirmam que uma resposta citotóxica efetiva não pode ser montada na ausência de células NK. (DEAUVIEAU et al., 2015; ORANGE, 2013; WONG et al.,2011)

Por sua vez, as células NKT representam cerca de 1 a 2 % das células circulantes no sangue periférico. Ao contrário dos linfócitos T convencionais, essas células conseguem interagir com antígenos glicolipídicos não clássicos. O que as fazem estarem entre a imunidade inata e adaptativa (BENDELAC, 2007; DIANA, 2009).

Uma das características principais, e que desperta grande interesse, é sua capacidade de secretar diferentes citocinas (IL-2, IL-4 e IFN- $\gamma$ ) poucas horas após a sua ativação justificando a sua enorme participação em respostas imunes variadas. Além disso, IFN-gama produzido por essas células é capaz de ativar células NK, reforçando esse braço do sistema imune (EBERT, 2000; GODFREY, 2000). O que leva a acreditar que essa população celular esteja ligada à proteção do indivíduo infectado (FERRAZ, 2015; DETILLIO, 2012; HAEBERLEIN ET AL. 2011; BOGDAN 2012).

Outros trabalhos ainda observaram a presença de um grande recrutamento de células NKT para o sítio das lesões de pacientes, o que poderia estar relacionado aos menores percentuais destas células observados no sangue periférico de pacientes com mais de uma lesão e em momentos tardios da infecção (>60 dias) e controle parasitário efetivo (PEREIRA et al., 2009, ROBERT- GANGNEUX et al., 2012).

Estudos sobre a distribuição das células NKT na LTA são escassos, tendo sido pouco documentado na literatura se estas células alteram seus percentuais com a doença, com o tratamento antimonial ou com a cura clínica. Alguns desses trabalhos mostraram que, pelo menos, em modelos murinos de LTA, essas células parecem bloquear a expansão do parasita e também impulsionar a resposta imune específica e protetora. (FERRAZ, 2017).

Em nosso trabalho percebemos que esse grupo celular está amplamente presente no sangue periférico de pacientes com LTA, mostrando-se expansivo frente à um segundo contato com o antígeno de *Leishmania braziliensis*. Essa resposta reafirma o que vem sendo descrito nos poucos estudos encontrados na literatura que correlacionam diretamente esse grupo de células à uma resposta imune específica e protetora. (FERRAZ, 2017).

## 7 CONCLUSÕES

- Os pacientes desse estudo foram em sua maioria homens, acima de 30 anos, moradores ou trabalhadores de regiões endêmicas para LTA
- Os pacientes apresentaram lesões características de LTA, com um período de evolução médio de 2,5 meses e diagnóstico clínico, laboratorial e epidemiológicos confirmados.
- Pudemos observar que na LTA há a participação da imunidade celular específica na doença;
- O balanço na proporção de células T CD4+, CD8+, DP, NK e NKT é importante para o controle da LTA.
- Células NK, NKT e T CD8+ apresentam grande potencial para o desenvolvimento de imunoterapias e vacinas, uma vez que seu papel na LTA seja mais bem elucidado.

## 8 PERSPECTIVAS

As perspectivas futuras desse trabalho incluem;

Explorar os fenômenos de citotoxicidade na LTA, por meio da utilização de anticorpos anti-CD107, granzima B para caracterizar NKs, seus subtipos e das T CD8+

Separação (sorting) das células CD8, NKs, CD3-NKs e NKTs por meio da caracterização dos seus perfis moleculares de citotoxicidade e citocinas (mRNA) e avaliar por meio de cultura celular com nova e estimulação antigênica a produção de citocinas/ perfil molecular.

## REFERENCIAS

ALMEIDA, A. F. **Avaliação da produção de citocinas Th17, Th1 e Th2 por linfócitos T em pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2013. 83 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2013.

AL-QADHI, B. N.; MUSA, I. S.; HUMMADI, Y. M. K. A. Comparative immune study on cutaneous leishmaniasis patients with single and multiple sores. **J Parasit Dis**, 21 nov 2013.

ALLSOPP, C. E.M. et al. flow cytometric method to assess antigen-specific proliferative responses of different subpopulations of fresh and cryopreserved human peripheral blood mononuclear cells. **J Immunol Methods**, v. 214, v.1-2, p.175-86, 1998.

ASSIS SOUZA, M. et al. American tegumentary leishmaniasis: cytokines and nitric oxide in active disease and after clinical cure, with or without chemotherapy. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oxford, v. 76, n. 2, p. 175–180, 2012

BAFICA AM, Cardoso LS, Oliveira SC, Loukas A, Goes A, Oliveira RR, Carvalho EM, Araujo MI: Changes in T-cell and Monocyte phenotypes *in vitro* by *S. mansoni* antigens in cutaneous leishmaniasis patients. *J. parasitol res.*2012

BACELLAR, O. et al. Interleukin 17 production among patients with American cutaneous leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 200, n. 1, p. 75–78, 2009

BELLO, N. R. **Estudo clínico e epidemiológico da leishmaniose tegumentar americana no departamento de pando, região fronteiriça entre o Brasil e a Bolívia**. 2014. 100 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.

BENTES, A. A.; et al. Leishmaniose tegumentar americana: um desafio diagnóstico na prática pediátrica. **Rev Med Minas Gerais**, v 25, p. 83-87, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2 ed atual. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010. 180 p.

BRELAZ, M. C. A. et al. Antigenic fractions of *Leishmania (Viannia) braziliensis*: the immune response characterization of patients at the initial phase of disease. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 34, n. 4, p. 236–9, 2012

BRELAZ DE CASTRO, M. C. A. B. **Estudo do papel de linfócitos T CD4+ e CD8+ e suas citocinas na Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2013. 135 f. Tese (Doutorado em Inovação Terapêutica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

BRITO, M. E. F. et al. Occupationally acquired american cutaneous leishmaniasis. **Case Reports in Dermatological Medicine**, Nova Iorque, v. 2012, p. 1-4, 2012.

BRITO, M. E. F.; et al. Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v 45, p. 425-429, jul-aug 2012.

BOGDAN, C. Natural killer cells in experimental and human leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Lausanne, v. 2, n. May, p. 69, 2012

Bottrel, R. L., W. O. Dutra, F. A. Martins, B. Gontijo, E. Carvalho, M. Barral-Netto, A. Barral, R. P. Almeida, W. Mayrink, R. Locksley, and K. J. Gollob. 2001. Flow cytometric determination of cellular sources and frequencies of key cytokine-producing lymphocytes directed against recombinant LACK and soluble *Leishmania* antigen in human cutaneous leishmaniasis. *Infect. Immun.* 69:3232

BUTSCH, F. et al. Two cases of successful treatment of multilesional cutaneous leishmaniasis with liposomal amphotericin B. **Journal der Deutschen Dermatologischen**

**Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology**, Weinheim, v. 11, n. 1, p.83–5, 2013

Cardoso LS, Oliveira SC, Araujo MI: *Schistosoma mansoni* antigens as modulators of the allergic inflammatory response in asthma. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 12:24-32, 2012

CARVALHO, L. P. et al. Protective and pathologic immune responses in human tegumentar leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 3, p. 301, 2012.

DANTAS, M. L.; et al. Comparative analysis of the tissue inflammatory response in human cutaneous and disseminated leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 2, p. 202-209, Apr. 2014.

DIAZ, N. L.; ZERPA, O.; TAPIA, F. J.. Chemokines and chemokine receptors expression in the lesions of patients with American cutaneous leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 108, n. 4, p. 446-452, June 2013.

DUTHIE, M. S. et al. The Development and Clinical Evaluation of Second-Generation Leishmaniasis Vaccines. **Vaccine**, Kidlington, v. 30, n. 2, p. 134–141, 2012

Godfrey, D. I., K. J. Hammond, L. D. Poulton, M. J. Smyth, and A. G. Baxter. 2000. NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol. Today* 21:573.

GONÇALVES, R. V. **Evidências clínicas e imunológicas da eficácia do tratamento da leishmaniose cutânea com baixas doses de antimonial pentavalente na manutenção de cura por longo tempo**. 2014. 99 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Medicina Tropical) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.

GOMES, A. C. A. et al. leishmaniose muco-cutânea: relato de caso clínico. **Revista de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial**. v. 4, n. 4, p. 223-228, out/dez 2004.

GOTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, V 36, P. 71-80, jan-fev 2003.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Rev. Anti Infect. Ther**, v 8, p. 419-433, 2010.

KEDZIERSKI, L.; EVANS, K. J. Immune responses during cutaneous and visceral leishmaniasis. **Parasitology**, n. 141, p. 1544-1562, 2014.

LINDOSO, J. A. L. Review of the current treatments for leishmaniasis. **Research and Reports in Tropical Medicine**, v. 3, p. 69–77, 2012

MACHADO, M. M. **Análise de diferentes cepas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* quanto a infectividade/virulência e perfil de citocinas e quimiocinas produzidas por macrófagos murinos infectados**. 2014. 136 f. Dissertação (Mestrado em Programa de Pós-Graduação Biologia Parasitária) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.

MARTINS, A. L. G. P.; et al. American tegumentary leishmaniasis: correlations among immunological, histopathological and clinical parameters. **An. Bras. Dermatol.**, v. 89, n. 1, p. 52-58, Feb. 2014.

MENDES, D. S.; et al. Inflammation in disseminated lesions: an analysis of CD4+, CD20+, CD68+, CD31+ and vW+ cells in non-ulcerated lesions of disseminated leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 1, p. 18-22, Feb. 2013.

NEVES, D. et al. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: REIS, A. B.; GONTIJO, C. M. F. **Parasitologia Humana**. 12 ed. São Paulo: Atheneu, 2011.

NYLÉN, S. e EIDSMO, L. Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 34, n. 12, p. 551–61, 2012

OLIVEIRA, A. P.; et al. Comparison of flow cytometry and indirect immunofluorescence assay in the diagnosis and cure criterion after therapy of American tegumentary leishmaniasis

by anti-live *Leishmania (Viannia) braziliensis* immunoglobulin G. **Journal of Immunological Methods**, v 387, p. 445-453, 2013.

OLIVEIRA, L. F. G.; GILBERT, B.; BÔAS, G. K. V. Oportunidades para inovação no tratamento da leishmaniose usando o potencial das plantas e produtos naturais como fontes de novos fármacos. **Revista Fitos**, v 8, p. 33-42, jan-mar 2013.

PEREIRA, V. R. A. et al. Evaluation of anti-livered and anti-fixed *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigote IgG antibodies detected by flow cytometry for diagnosis and posttherapeutic cure assessment in localized cutaneous leishmaniasis. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, Philadelphia, v. 74, n. 3, p. 292–8, 2012.

RAPHAEL, I.; et al. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. **Elsevier**, n. 74, p. 5-17, 2015.

REITHINGER, R.; et al. Cutaneous Leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 7, p. 581-596, 2007.

ROUQUAYROL, M. Z.; GURGEL, M. Epidemiologia Clínica. In: MEDEIROS, M. M. C.; ABREU, M. M. **Epidemiologia & Saúde**. 7 ed. Rio de Janeiro: Medbook, 2013.

RUGANI, J. M. N. **Estudo da Variabilidade Genética de *Leishmania (Viannia) braziliensis* em Minas Gerais, Brasil**. 2015. 107 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde) - Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte, 2015.

SANTOS-MATEUS, D. et al. The Battle between *Leishmania* and the Host Immune System at a Glance. **International Trends in Immunity**, v. 4, n. 1, p. 28-34, 2016.

SAVOIA, D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. **J Infect Dev Ctries**, v. 9, n. 6, p. 588-596, 2015.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO – SINAN. Disponível em: <http://www.portalsinan.saude.gov.br/>. Acesso em: 31 de março de 2017.

SOUZA, M. A. et al. American Tegumentary Leishmaniasis: Cytokines and Nitric Oxide in Active Disease and After Clinical Cure, With or Without Chemotherapy. **Scandinavian Journal of Immunology**, v 76, p. 175-180, 2012.

SOUZA, M. A. **Quantificação de mediadores dos perfis Th1, Th2, Th17 e Treg na resposta imune contra Leishmaniose Tegumentar Americana ativa e após cura clínica.** 2014. 138 f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

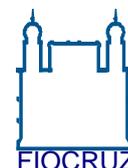
TIUMAN, T. S.; et al. Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases**, v 15, p. 525-532, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Disponível em: [http://www.who.int/gho/neglected\\_diseases/leishmaniasis/en/](http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/). Acesso em: 06 de Janeiro de 2017.

## APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO PACIENTE



Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde  
Centro de Pesquisas  
AGGEU MAGALHÃES



### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Grupo Paciente

Projeto: “Caracterização da resposta imunológica em pacientes portadores de Leishmaniose Tegumentar Americana Ativa e após cura clínica”.

O objetivo principal desse projeto é a análise de aspectos biológicos que pode ter influência na doença causada por *Leishmania Viannia braziliensis*. A *Leishmania* é um parasita do homem que causa doença (lesões) na pele, conhecida como leishmaniose tegumentar (ferida brava). Além disso, o projeto também pretende identificar alterações biológicas hereditárias (mutações) humanas que contribuem para o agravamento dessa doença.

O senhor e algumas pessoas da sua família estão sendo convidados a participar deste estudo porque moram em uma região onde a leishmaniose é comum. O senhor será acompanhado por visitas em sua casa, com objetivo de identificar se alguém de sua família foi contaminado pelo parasita que causa a leishmaniose. Para isto, as pessoas que moram em sua casa serão consultadas.

Como o senhor faz parte do grupo de pacientes, será solicitada uma coleta de sangue de 40 ml, o que equivale a quatro colheres de sopa. A coleta de 40 mL de sangue ocorrerá em dois momentos, ou seja, antes e depois do tratamento. Serão também realizados exames para confirmar sua doença e que incluirão a intradermoreação de Montenegro e biópsia da borda da ferida. Todas as informações e detalhes dos exames que serão realizados serão previamente esclarecidos para o senhor. Além disso, o senhor também receberá os resultados desses exames. Todo procedimento será realizado com material estéril descartável e por profissionais de saúde de reconhecida capacidade. A coleta de sangue pode causar um leve desconforto, como dor no local da punção, e, raramente, pode levar ao aparecimento de uma mancha roxa ao redor da picada, causada pelo extravasamento de pequena quantidade de sangue (hematoma). A biópsia é a retirada de um pequeno pedaço da lesão, aplicando-se um anestésico; normalmente, não oferece riscos, exceto um pequeno sangramento no local ou um ponto de infecção, que pode ser tratado com limpeza e medicação locais. A biópsia será realizada pela médica participante do projeto no hospital onde ela trabalha. O transporte para realização da retirada da biópsia será feito pela secretaria de saúde de seu município.

O remédio utilizado para o tratamento será o Glucantime® e o senhor tomará injeções no braço ou nas nádegas em doses de 20 mg/Kg/dia em ciclos de vinte a trinta dias, sendo realizado no posto de saúde do município do presente estudo por médicos, enfermeiros ou auxiliares de enfermagem. Esse remédio (Glucantime®) é o mais utilizado, promove cura da doença e pode ter

efeitos colaterais como náuseas e indisposição (moleza). Se ocorrer qualquer alteração em seu organismo, o senhor deverá procurar o médico do posto de saúde. O senhor não terá gastos em decorrência dos testes ou tratamento que realizará. Os benefícios em participar deste estudo são que o senhor e os membros de sua família serão estudados para avaliar se apresentam algum sinal de infecção ou se são imunes a desenvolver a leishmaniose. Esse trabalho trará grande benefício no estudo da leishmaniose, pois ajudará a entender melhor sobre a proteção das pessoas a esta doença. O senhor pode solicitar informações sobre o projeto a qualquer momento caso julgue necessário. O senhor poderá recusar ou retirar seu consentimento, em qualquer momento da investigação, sem qualquer punição ou prejuízo.

A Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ) está autorizada a utilizar as informações obtidas através dos resultados dos procedimentos em reuniões, congressos, patentes e publicações científicas preservando, neste caso, a sua identidade. O CPqAM/FIOCRUZ poderá também estocar o material coletado para posteriores estudos, e para isso um pesquisador do projeto entrará em contato com o senhor. O senhor poderá contactar o CEP/CPqAM para saber se a pesquisa foi avaliada e aprovada quanto à ética do estudo. Da mesma forma o CEP poderá ser contactado através do endereço Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Avenida Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, caixa postal 7472, CEP: 50670-420, Recife-PE, Brasil, telefone (81) 21012639 em caso de alguma denúncia de sua parte referente a essa pesquisa.

Caso sofra qualquer tipo de dano previsto ou não no termo de consentimento e resultante de sua participação, além do direito à assistência integral, o senhor terá direito à indenização. O pesquisador, o patrocinador e a instituição devem assumir a responsabilidade de dar assistência integral às complicações e danos decorrentes dos riscos previstos. Caso o senhor tenha alguma despesa por causa da sua participação nesta pesquisa, o senhor terá direito de receber o seu dinheiro de volta.

Este documento é feito em duas vias, ficando uma em sua posse e a outra com a equipe do projeto e que todas e quaisquer dúvidas que o senhor venha a ter sobre o significado dos termos empregados nesse texto lhe serão completamente esclarecidos por um dos membros do projeto antes que o senhor assine este impresso.

### DECLARAÇÃO DO PARTICIPANTE

Eu,....., (identidade:.....), li e concordo em participar como voluntário neste projeto que envolverá o Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ).

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente

\_\_\_\_\_  
data

\_\_\_\_\_  
Endereço do paciente para contato

\_\_\_\_\_  
data

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador responsável

\_\_\_\_\_  
data

\_\_\_\_\_  
Assinatura do médico responsável – CPqAM/FIOCRUZ

\_\_\_\_\_  
data

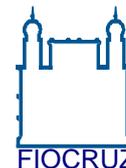
Endereço profissional do pesquisador responsável (Valéria Rêgo Alves Pereira): Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Av. Moraes Rêgo, s/n°, Recife, fone: (81) 21012631.

## APENDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – PACIENTE MENOR QUE 18 ANOS



Centro de Pesquisas  
AGGEU MAGALHÃES

Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde



### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Grupo Paciente Menor de 18 anos

Projeto: “Caracterização da resposta imunológica em pacientes portadores de Leishmaniose Tegumentar Americana Ativa e após cura clínica”.

O objetivo principal desse projeto é a análise de aspectos biológicos que pode ter influência na doença causada por *Leishmania Viannia braziliensis*. A *Leishmania* é um parasita do homem que causa doença (lesões) na pele, conhecida como leishmaniose tegumentar (ferida brava). Além disso, o projeto também pretende identificar alterações biológicas hereditárias (mutações) humanas que contribuem para o agravamento dessa doença.

O senhor e seu filho (a) estão sendo convidados a participar deste estudo porque moram em uma região onde a leishmaniose é comum. O senhor será acompanhado por visitas em sua casa, com objetivo de identificar se alguém de sua família foi contaminado pelo parasita que causa a leishmaniose. Para isto, as pessoas que moram em sua casa serão consultadas.

Como responsável pelo menor, o senhor está sendo convidado a participar deste estudo devido ao mesmo se encontrar no grupo de pacientes menores de 18 anos. Será solicitada uma coleta de sangue de 20 ml, o que equivale a duas colheres de sopa. A coleta de 20 mL de sangue ocorrerá em dois momentos, ou seja, antes e depois do tratamento. Serão também realizados exames para confirmar a doença e que incluirão a intradermoreação de Montenegro e biópsia da borda da ferida. Todas as informações e detalhes dos exames que serão realizados serão previamente esclarecidos para o senhor que é responsável pelo menor. Além disso, o senhor também receberá os resultados desses exames. Todo procedimento será realizado com material estéril descartável e por profissionais de saúde de reconhecida capacidade. A coleta de sangue pode causar um leve desconforto, como dor no local da punção, e, raramente, pode levar ao aparecimento de uma mancha roxa ao redor da picada, causada pelo extravasamento de pequena quantidade de sangue (hematoma). A biópsia é a retirada de um pequeno pedaço da lesão, aplicando-se um anestésico; normalmente, não oferece riscos, exceto um pequeno sangramento no local ou um ponto de infecção, que pode ser tratado com limpeza e medicação locais. A biópsia será realizada pela médica participante do projeto no hospital onde ela trabalha. O transporte para realização da retirada da biópsia será feito pela secretaria de saúde de seu município.

O remédio utilizado para o tratamento será o Glucantime® e o paciente menor de idade tomará injeções no braço ou nas nádegas em doses de 20 mg/Kg/dia em ciclos de vinte a trinta dias, sendo realizado no posto de saúde do município do presente estudo por médicos, enfermeiros ou auxiliares de enfermagem. Esse remédio (Glucantime®) é o mais utilizado, promove cura da doença e pode ter efeitos colaterais como náuseas e indisposição (moleza). Se ocorrer qualquer alteração no organismo do menor, o senhor deverá procurar o médico do posto de saúde. O senhor não terá

gastos em decorrência dos testes ou tratamento que o menor realizará. Os benefícios em participar deste estudo são que o senhor, o menor por quem o senhor é responsável e os outros membros de sua família serão estudados para avaliar se apresentam algum sinal de infecção ou se são imunes a desenvolver a leishmaniose. Esse trabalho trará grande benefício no estudo da leishmaniose, pois ajudará a entender melhor sobre a proteção das pessoas a esta doença. O senhor pode solicitar informações sobre o projeto a qualquer momento caso julgue necessário. O senhor poderá recusar ou retirar o consentimento do menor, em qualquer momento da investigação, sem qualquer punição ou prejuízo.

A Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ) está autorizada a utilizar as informações obtidas através dos resultados dos procedimentos em reuniões, congressos, patentes e publicações científicas preservando, neste caso, a sua identidade. O CPqAM/FIOCRUZ poderá também estocar o material coletado para posteriores estudos, e para isso um pesquisador do projeto entrará em contato com o senhor. O senhor poderá contactar o CEP/CPqAM para saber se a pesquisa foi avaliada e aprovada quanto à ética do estudo. Da mesma forma o CEP poderá ser contactado através do endereço Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Avenida Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, caixa postal 7472, CEP: 50670-420, Recife-PE, Brasil, telefone (81) 21012639 em caso de alguma denúncia de sua parte referente a essa pesquisa.

Caso o menor sofra qualquer tipo de dano previsto ou não no termo de consentimento e resultante de sua participação, além do direito à assistência integral, o senhor como responsável pelo menor terá direito à indenização. O pesquisador, o patrocinador e a instituição devem assumir a responsabilidade de dar assistência integral às complicações e danos decorrentes dos riscos previstos. Caso o senhor tenha alguma despesa por causa da participação do menor pelo qual é responsável nesta pesquisa, o senhor terá direito de receber o seu dinheiro de volta.

Este documento é feito em duas vias, ficando uma em sua posse e a outra com a equipe do projeto e que todas e quaisquer dúvidas que o senhor venha a ter como responsável pelo menor sobre o significado dos termos empregados nesse texto lhe serão completamente esclarecidos por um dos membros do projeto antes que o senhor assine este impresso.

### DECLARAÇÃO DO PARTICIPANTE

Eu,....., ,  
(identidade:.....), responsável pelo menor.....  
....., li e concordo em participar como voluntário neste projeto que envolverá o Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ).

\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável pelo menor

\_\_\_\_\_  
data

\_\_\_\_\_  
Endereço do responsável pelo menor

\_\_\_\_\_  
data

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador responsável

\_\_\_\_\_  
data

\_\_\_\_\_  
Assinatura do médico responsável – CPqAM/FIOCRUZ

\_\_\_\_\_  
data

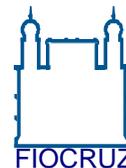
Endereço profissional do pesquisador responsável (Valéria Rêgo Alves Pereira): Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Av. Moraes Rêgo, s/n°, Recife, fone: (81) 21012631.

## APENDICE C - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO CONTROLE



Centro de Pesquisas  
AGGEU MAGALHÃES

Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde



### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Grupo Controle

Projeto: “Caracterização da resposta imunológica em pacientes portadores de Leishmaniose Tegumentar Americana Ativa e após cura clínica”.

O objetivo principal desse projeto é a análise de aspectos biológicos que pode ter influência na doença causada por *Leishmania Viannia braziliensis*. A *Leishmania* é um parasita do homem que causa doença (lesões) na pele, conhecida como leishmaniose tegumentar (ferida brava). Além disso, o projeto também pretende identificar alterações biológicas hereditárias (mutações) humanas que contribuem para o agravamento dessa doença.

O senhor e algumas pessoas da sua família estão sendo convidados a participar deste estudo porque moram em uma região onde a leishmaniose é comum. O senhor será acompanhado por visitas em sua casa, com objetivo de identificar se alguém de sua família foi contaminado pelo parasita que causa a leishmaniose. Para isto, as pessoas que moram em sua casa serão consultadas.

O senhor está sendo convidado a participar deste estudo por se encontrar no grupo controle, ou seja, grupo de indivíduos que não apresentam a doença e que servirão de comparação com os indivíduos doentes. Ao senhor será solicitada uma única coleta de sangue de 40 ml o que equivale a uma colher de sopa. Todo procedimento será realizado com material estéril descartável e por profissionais de saúde de reconhecida capacidade. A coleta de sangue pode causar um leve desconforto, como dor no local da punção, e, raramente, pode levar ao aparecimento de uma mancha roxa ao redor da picada, causada pelo extravasamento de pequena quantidade de sangue (hematoma). Esse trabalho trará grande benefício no estudo da leishmaniose, pois ajudará a entender melhor sobre a proteção das pessoas a esta doença. O senhor pode solicitar informações sobre o projeto a qualquer momento caso julgue necessário. O senhor poderá recusar ou retirar o seu consentimento, em qualquer momento da investigação, sem qualquer punição ou prejuízo.

A Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ) está autorizada a utilizar as informações obtidas através dos resultados dos procedimentos em reuniões, congressos, patentes e publicações científicas preservando, neste caso, a sua identidade. O CPqAM/FIOCRUZ poderá também estocar o material coletado para posteriores estudos, e para isso um pesquisador do projeto entrará em contato com o senhor. O senhor poderá contactar o CEP/CPqAM para saber se a pesquisa foi avaliada e aprovada quanto à ética do estudo. Da mesma forma o CEP poderá ser contactado através do endereço Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Avenida Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, caixa postal 7472, CEP: 50670-420, Recife-PE, Brasil, telefone (81) 21012639 em caso de alguma denúncia de sua parte referente a essa pesquisa.

Caso sofra qualquer tipo de dano previsto ou não no termo de consentimento e resultante de sua participação, além do direito à assistência integral, o senhor terá direito à indenização. O pesquisador, o patrocinador e a instituição devem assumir a responsabilidade de dar assistência integral às complicações e danos decorrentes dos riscos previstos. Caso o senhor tenha alguma



## ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



### PARECER DE RELATÓRIO PARCIAL

**Título:** CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM PACIENTES PORTADORES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA ATIVA E APÓS CURA CLÍNICA

**Pesquisador responsável:** Valéria Pereira Hernandes

**Instituição de realização do Projeto:** CPqAM

**Instituições Envolvidas:** CPqAM/ FIOCRUZ

**Data de aprovação do projeto no CEP/CPqAM:** 04/04/2013

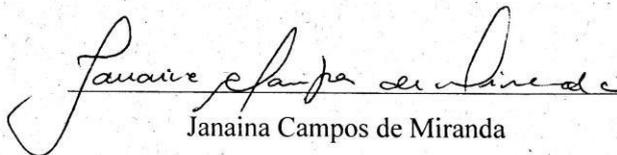
**Data de apreciação do relatório parcial no CEP/CPqAM:** 30/03/2016

**Registro no CAAE:** 11083812.7.0000.5190

Prezada Dra., Valéria Pereira Hernandes

Após analisar o relatório parcial referente ao projeto em pauta na reunião do CEP/CPqAM que ocorreu dia 14 de Junho de 2016, informamos que o referido relatório foi deferido, pois se encontra em concordância com a Resolução sobre diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos, Res. 466 do Conselho Nacional de Saúde, de 12 de dezembro de 2012 e complementares. O CEP/CPqAM defere também quanto à solicitação da pesquisadora responsável pelo projeto para prorrogação de prazo de conclusão do estudo, que fica alterada para 03 de julho de 2019.

Recife, 26 de julho de 2016.

  
Janaina Campos de Miranda

Coordenadora CEP/CPqAM/FIOCRUZ

Campus da UFPE - Av. Moraes Rego, s/n  
50.670-420 Fone: (81) 2101.2639  
(81) 3453.1911 | 2101.2639  
Recife, PE, Brasil  
http://cepedeticas.cpqam.fiocruz.br

  
AGGEU  
MAGALHÃES

  
FIOCRUZ  
Ministério da Saúde